



**Universitat de les Illes Balears**

**Laboratori d'Investigació en Litiasi Renal**

Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut

**Departament de Química**

**Estudios sobre factores cinéticos implicados en la  
litiasis renal oxalocálcica: nucleación heterogénea  
e inhibidores de la cristalización**

**Tesis Doctoral**

Bernat Isern Amengual  
Septiembre, 2007



## Directores de la Tesis Doctoral

Dr. Fèlix Grases Freixedas  
Catedrático de Química Analítica  
Universitat de les Illes Balears

Dra. Antònia Costa-Bauzà  
Titular de Escuela Universitaria  
Universitat de les Illes Balears

Memoria presentada por  
Bernat Isern Amengual  
Licenciado en Química,  
para aspirar al grado de Doctor



El Dr. Fèlix Grases Freixedas, catedrático de Química Analítica de la Universitat de les Illes Balears y la Dra. Antònia Costa-Bauzà, profesora titular de escuela universitaria de Toxicología de la Universitat de les Illes Balears,

certifican:

Que el presente trabajo de investigación, titulado **Estudios sobre factores cinéticos implicados en la litiasis renal oxalocálcica: nucleación heterogénea e inhibidores de la cristalización**, ha sido realizado bajo su dirección y constituye la Tesis Doctoral presentada por Bernat Isern Amengual.

Palma de Mallorca, Septiembre 2007

Dr. Fèlix Grases Freixedas

Dra. Antònia Costa-Bauzà



**A la meva família**





En primer lloc, voldria agrair al Dr. Fèlix Grases i a la Dra. Antònia Costa-Bauzà per l'extraordinària tasca duta a terme en la direcció d'aquesta tesi. Molt especialment al Dr. Fèlix Grases, el qual, amb els seus coneixements, capacitat inventiva i gran agudeses, ha permès la realització d'aquesta investigació. A ell també, manifestar-li la meua màxima gratitud en confiar-me la responsabilitat d'un projecte professional de futur lligat a aquest món, la investigació.

A la Dra. Antònia Costa-Bauzà, donar gràcies per la seva inestimable ajuda i assessorament en el dia a dia i en la disponibilitat que sempre oferia per solventar qualsevol dels problemes que se'm plantejaren, per petits que fossin.

Al Dr. Rafel Prieto, agrair-li també l'esforç i l'interès mostrat en tot moment per ajudar-me en les dificultats que anaven sorgint al llarg d'aquest temps, sobretot en els aspectes biològics.

A ells dos, els hi voldria reconèixer l'excel·lent tasca que duen a terme en el grup de recerca, la qual permet que aquest equip tingui prosperitat i èxit.

També voldria fer una menció especial a en Joan Perelló, el qual em va guiar durant les primeres etapes i amb qui he treballat conjuntament, de forma harmoniosa i coordinada, des de l'inici fins a dia d'avui. Tant és així, que fruit d'aquest treball esperem tenir un futur dins el món de la investigació amb un projecte molt prometedori i il·lusionant.

A na Pilar Sanchis, companya i també amiga, que més recentment s'ha unida al grup i amb la qual faig feina amb molt de gust. A la Dra. Margalida Ramis, pels bons moments que hem passat. En general, agrair a tots els components del grup pel bon ambient de feina i pel tracte personal que s'ha creat.

No vull oblidar-me d'en Mateu Gual, company de laboratori i millor persona, qui m'ha donat sempre el seu ajut i amb qui he passat molt bones estones; ni oblidar-me de la companyia i ajuda de tots els professors i col·laboradors que han passat pel laboratori: la Dra. Ivana Vucenik (Universitat de Maryland, Baltimore, USA), Dr Otakar Söhnle (Universitat J.E. Purkinje, República Txeca), en Joan Ramonell, na Catiana Rosselló i en Toni Frontera.

Agrair també al Dr. J.J. Torres, de l'Hospital Universitari Son Dureta per a la seva col·laboració en les anàlisis histològiques dutes a terme, als Laboratoris Authex S.A., per a la seva ajuda en la preparació dels productes necessaris per als estudis del capítol 3, així com al Dr. Ferran Ferro, al Dr. José González i a la Dra. Teresa de Francisco dels serveis científico-tècnics de la UIB, per a la seva ajuda i disponibilitat en tot moment davant qualsevol repte.

Finalment, i no menys important, agrair als meus pares, Joan i Joana, i a la meva germana Rosa tots els esforços i sofriments que han suportat i el recolzament i ajut que m'han ofert en tot moment i, en particular, durant la realització d'aquesta tesi.

A la meva al·lota Laura, agrair se'm queda curt; ella és qui més temps ha passat amb jo durant aquests anys, qui m'ha recolzat, animat, ajudat,... tant en els moments d'eufòria i èxit com en els de tristor i desconsol, sempre hi ha estat.

Per acabar, vull agrair a totes aquelles persones que d'una manera o altre m'han ajudat i han fet possible la realització d'aquest treball.

A tots ells, moltes gràcies.

*Índice*



# Índice

<b>Objetivos</b>	<b>1</b>
<b>Capítulo 1. Introducción general</b>	<b>5</b>
1. Epidemiología de la urolitiasis	10
2. Mecanismos de formación de los cálculos	11
2.1. Mecanismo de formación y estructura de los cálculos de oxalato cálcico	13
2.1.1. Oxalato cálcico monohidrato (Whewellita)	13
2.1.1.1. Formación y estructura de los cálculos de COM papilares	14
2.1.1.2. Formación y estructura de los cálculos de COM de cavidad	19
2.1.2. Oxalato cálcico dihidrato (Wheddellita)	20
2.2. Mecanismo de formación y estructura de los cálculos mixtos COD/HAP	21
2.3. Mecanismo de formación y estructura de los cálculos de fosfato	22
2.3.1. Cálculos de hidroxapatita (HAP)	23
2.3.2. Cálculos de brushita (BRU)	24
2.3.3. Cálculos de estruvita (FAM)	25
2.4. Mecanismo de formación y estructura de los cálculos de ácido úrico	26
2.5. Mecanismo de formación y estructura de los cálculos de cistina	26
2.6. Mecanismo de formación y estructura de cálculos poco frecuentes	27
Bibliografía	29
<b>Capítulo 2. Nucleación heterogénea y litiasis oxalocálcica</b>	<b>43</b>
<i>Introducción</i>	45
1. Mecanismo de formación de cristales	47
1.1. Nucleación	47
1.1.1. Nucleación primaria	48
1.1.1.1. Nucleación primaria homogénea	48
1.1.1.2. Nucleación primaria heterogénea	50
1.1.2. Nucleación secundaria	52
1.1.2.1. Nucleación secundaria falsa	53
1.1.2.2. Nucleación secundaria verdadera	53
1.1.2.3. Nucleación secundaria de contacto	54
1.2. Crecimiento cristalino	55
1.2.1. Condiciones energéticas durante el crecimiento de los cristales	57
1.2.2. Dislocaciones en los cristales	58
1.3. Agregación	59
1.3.1. Agregación primaria	59
1.3.2. Agregación secundaria	60
2. Periodo de inducción de la cristalización	62
3. Inhibidores de la cristalización	63
3.1. El magnesio	65
3.2. El pirofosfato	65
3.3. Las moléculas polianiónicas	66
3.3.1. Los GAGS	66
3.3.2. Las glicoproteínas	69
3.4. El citrato	71
3.5. El fitato	72
4. Experimentos <i>in vitro</i>	75

5. Nucleantes heterogéneos en la litiasis	78
5.1. Litiasis residual	84
Bibliografía	89
<i>Experimental, resultados y discusión: artículo original I</i>	119
<i>Experimental, resultados y discusión: artículo original II</i>	127
<i>Experimental, resultados y discusión: artículo original III</i>	135
<i>Experimental, resultados y discusión: artículo original IV</i>	143
<i>Experimental, resultados y discusión: artículo original V</i>	151
<i>Experimental, resultados y discusión: artículo original VI</i>	161
<i>Experimental, resultados y discusión: artículo original VII</i>	171
<i>Experimental, resultados y discusión: Anexo 1</i>	191
<i>Experimental, resultados y discusión: Anexo 2</i>	199
<b>Capítulo 3. Absorción del fitato a través de la piel</b>	<b>205</b>
<i>Introducción</i>	207
1. La piel	209
1.1. Estructura de la piel	209
1.1.1. Epidermis	210
1.1.2. Dermis o corion	212
1.1.2.1. Glandulares	213
1.1.2.2. Cornis	213
1.1.3. Tejido subcutáneo, subcutis o hipodermis	214
1.2. Funciones de la piel	215
2. Absorción tópica	215
3. El fitato	221
3.1. Localización del fitato	221
3.2. Absorción, distribución, excreción y toxicidad del fitato	222
3.2.1. Estudios con animales de experimentación	222
3.2.2. Estudios con humanos	223
3.3. Fitato y biodisponibilidad mineral	224
3.4. Efectos beneficiosos del fitato	225
3.4.1. Actividad antineoplásica (anticancerígena) del fitato	225
3.4.2. Acción del fitato en enfermedades cardiovasculares	226
3.4.2.1. Dislipidemia	226
3.4.2.2. Agregación de plaquetas	227
3.4.3. Utilidad del fitato en el tratamiento de la hipercalcemia	227
Bibliografía	228
<i>Experimental, resultados y discusión: artículo original I</i>	239
<i>Experimental, resultados y discusión: artículo original II</i>	245
<b>Conclusiones</b>	<b>249</b>

## ***Objetivos***





## OBJETIVOS

Los objetivos particulares de esta memoria se engloban dentro de los objetivos generales del Laboratorio de Investigación en Litiasis Renal de la Universitat de les Illes Balears, en el sentido de profundizar en los diferentes aspectos moleculares implicados en la formación de los cálculos renales y calcificaciones patológicas. Debe tenerse en cuenta que únicamente un conocimiento profundo de estos mecanismos permitirá el establecimiento de métodos de diagnóstico adecuados y medidas profilácticas realmente eficaces.

En esta Tesis Doctoral se pretende efectuar un estudio de la capacidad que presentan los fragmentos residuales de cálculos renales cálcicos obtenidos a partir del tratamiento con litotricia extracorpórea por ondas de choque para actuar como nucleantes heterogéneos, así como de diferentes sustancias (tales como fluoruro cálcico, glicoproteínas, materia orgánica y detritus celulares), con el fin de poder establecer dicha capacidad, ya que a pesar de ser conocida, no existen estudios comparativos que valoren su diferente eficacia. Por otra parte también se efectuará un estudio comparativo del efecto de diferentes inhibidores de la cristalización en la nucleación heterogénea del oxalato cálcico sobre estos sustratos, ya que no existe en bibliografía ningún estudio en este sentido y sin duda el potencial profiláctico de los inhibidores en el tratamiento de la litiasis renal es de gran trascendencia.

Finalmente, conocida la importancia del fitato como inhibidor de la litiasis oxalocálcica y después del hallazgo reciente de la posibilidad de ser administrado por vía tópica en animales de experimentación, uno de los objetivos de esta tesis doctoral consiste en el estudio por una parte de la administración por vía tópica en humanos y por otra, en el estudio *in vivo* del efecto del vehículo en la administración tópica de esta sustancia, ya que además de su interés práctico, permitirá aportar importantes datos que posibilitarán conocer su mecanismo de absorción transdérmica.



# *Capítulo 1*

## *Introducción general*



## INTRODUCCIÓN

Cuando un sistema contiene un soluto en cantidad superior a la permitida por su producto de solubilidad se dice que el sistema está sobresaturado. Por encima de ciertos valores de sobresaturación (sobresaturación crítica,  $S_c$ ) se produce la precipitación de forma instantánea. El intervalo entre la concentración de saturación y la concentración a partir de la cual se produce la precipitación instantánea se denomina zona metaestable. En esta zona, el medio se encuentra en una situación inestable desde el punto de vista termodinámico, es decir, en unas condiciones en que el sistema tarde o temprano cristalizará (con la finalidad de llegar al estado de equilibrio termodinámico).

El tiempo necesario para que en un sistema sobresaturado se inicie la cristalización depende de varios factores, por lo que puede tardar desde décimas de segundo a años. Estos factores son determinantes [BALAJI, 1997; FLEISCH, 1978] para evitar cristalizaciones indiscriminadas (en condiciones normales) dentro del organismo [GRASES, 1999a], a pesar de que los diferentes fluidos biológicos se encuentran permanentemente sobresaturados respecto algunas sustancias. Así, la orina está sobresaturada respecto al oxalato cálcico [FINLAYSON, 1978a], y según el pH, puede encontrarse sobresaturada respecto al ácido úrico a  $\text{pH} < 5.5$  o al fosfato cálcico en forma de hidroxiapatita (HAP,  $\text{Ca}_5\text{OH}(\text{PO}_4)_3$ ) a  $\text{pH} > 6.0$  [GRASES, 1997]. La sangre y los otros fluidos intersticiales se encuentran sobresaturados respecto al fosfato cálcico.

De hecho, las cristalizaciones en el organismo suelen darse sólo en situaciones biológicamente controladas, tales como la formación de los huesos y de los dientes. Aun así, las cristalizaciones patológicas descontroladas pueden ser abundantes y tener naturaleza diversa:

- Formación de cálculos: en los riñones (nefrolito), en las vías urinarias (urolito), en los conductos biliares (cálculo biliar), en las glándulas o conductos salivales (sialolito), en las venas varicosas (flebolito), en el estómago (gastrolito), en las orejas (otolito), en el intestino (enterolito), en las glándulas y la cisterna mamarias (galactolito),...
- Calcificaciones cardiovasculares.
- Calcificaciones de tejidos asociados al cáncer.

- **Condrocálcinosis:** Enfermedad articular crónica que se produce a consecuencia de un excesivo depósito de cristales de pirofosfato cálcico deshidratado en cartílago articular o fibrocartílago.
- **Podagra cálcica:** Consiste en la inflamación aguda o subaguda del pie, particularmente de la primera articulación metatarsofalángica, causada por el depósito de cristales de fosfatos básicos de calcio (hidroxiapatita carbonatada, fosfato ortocálcico y fosfato tricálcico).
- **Cristalización de uratos** en enfermos de gota.

Para explicar la formación de cálculos renales se deben considerar tres aspectos principales relacionados con la composición del medio [BALAJI, 1997; COE, 1997; FLEISCH, 1978; GRASES, 1996a; GRASES, 1999a; GRASES, 2000a; MANDEL, 1996; ROSE, 1975; TISELIUS, 1997]:

1.- La sobresaturación: una disolución sobresaturada es estable sólo durante un periodo de tiempo limitado, dependiendo de la sobresaturación existente. Cuanto mayor sea ésta, menor es el tiempo de estabilidad aparente. En condiciones fisiológicas la sobresaturación no se mantiene constante sino que oscila dentro de unos límites. La sobresaturación es la fuerza impulsora de la cristalización, siendo un factor termodinámico [FINLAYSON, 1978a; MANDEL, 1996], aunque por sí sola no es suficiente para el desarrollo del cálculo. No obstante, los elevados valores de sobresaturación que presentan los pacientes formadores de cálculos coinciden con su composición [PARKS, 1997].

2.- El déficit de inhibidores de la cristalización [SARIKA, 1997]: los inhibidores de la cristalización son sustancias orgánicas o inorgánicas que evitan o dificultan el desarrollo de cristales [LIESKE, 1996]. Pueden actuar en una o varias de las etapas fundamentales implicadas en su formación: a nivel de nucleación, crecimiento cristalino y/o agregación. Se trata de un factor cinético. Su efectividad depende tanto de su propia concentración como de la sobresaturación de las especies insolubles, siendo especialmente decisivos en aquellos casos en que no se alcanzan sobresaturaciones demasiado elevadas.

Entre los inhibidores de la litiasis renal, de los cuales se hablará de forma detallada en el Capítulo 2 de esta tesis, podemos destacar:

- **Compuestos macromoleculares:** glicosaminoglicanos y glicoproteínas.
- **Compuestos de bajo peso molecular:** fitato, citrato, pirofosfato y magnesio.

3.- La presencia de nucleantes heterogéneos [*KONYA, 2003*]: los nucleantes heterogéneos son sustancias promotoras de la cristalización. También se trata de un factor cinético. Su presencia puede ser debida a la precipitación de productos insolubles en la orina, dando lugar a partículas que, cuando quedan atrapadas, constituyen núcleos heterogéneos sobre los cuales se puede producir el crecimiento del cálculo. Es importante que las pequeñas partículas que se formen sean eliminadas rápidamente como cristaluria para evitar el posible desarrollo de una concreción mayor que podría quedar retenida, originando así la formación del cálculo [*GRASES, 1998a*]. Entre los nucleantes heterogéneos encontramos macromoléculas, restos celulares, lesiones epiteliales, núcleos de ácido úrico en orinas muy ácidas, núcleos de fosfatos cálcicos en orinas muy básicas, núcleos de fármacos y sus metabolitos (triamtereno) o de otras sustancias insolubles ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{CaF}_2$ ) [*CERINI, 1999; FASSANO, 2001; KHAN, 1995; KHAN, 1997; KHAN, 2002; LIESKE, 1998*]. El papel de los nucleantes heterogéneos en la formación de cálculos renales es un tema que tiene que estudiarse con mayor detalle, lo que conformará uno de los aspectos de esta tesis. Además, es muy frecuente encontrar en bibliografía sustancias que han sido descritas en unos casos como promotores y en otros como inhibidores de la litiasis cálcica.

En condiciones fisiológicas normales los factores promotores de la cristalización están compensados por los factores inhibidores evitando así la formación de cristales. Sin embargo, cuando se produce una ligera modificación de alguno de ellos llegan a producirse cristalizaciones indiscriminadas que terminan provocando procesos patológicos.

De esta manera, la formación de los cálculos renales constituye un problema multifactorial donde deben considerarse factores de riesgo relacionados con la composición de la orina (anteriormente explicados) y por otra parte factores de riesgo relacionados con la morfología renal [*CHANDHOKE, 1999; GRASES, 1998b; GRASES, 2002; SCHULZ, 1989a; SCHULZ, 1989b; SEE, 1992*]:

- a) Presencia de cavidades de baja eficacia urodinámica: son cavidades renales donde queda retenida la orina durante largos períodos de tiempo. La orina puede contener pequeños cristales y/o materia orgánica, que en condiciones normales son eliminados como cristaluria asintomática. Sin embargo, en situaciones en que la orina queda retenida, esas partículas pueden inducir la formación de un cálculo.

- b) Alteraciones que se pueden producir en el epitelio que recubre la papila renal, como por ejemplo una reducción de la capa antiadherente de glicosaminoglicanos, ataques bacterianos, necrosis, renovación del urotelio o como consecuencia de heridas provocadas por la presencia de un cálculo. Estas alteraciones pueden inducir la formación de un cálculo papilar (cálculo unido a la papila renal).

Aunque la litiasis renal depende de la coexistencia de varios factores alterados (de los dos grupos [GALÁN, 1996; LANCINA, 1999, COE, 2005]), en la mayoría de ocasiones corrigiendo sólo algunos de estos factores (no necesariamente todos) se evita el desarrollo de nuevos cálculos [GRASES, 2000a].

## 1. Epidemiología de la urolitiasis

La urolitiasis predomina clínicamente en la tercera y cuarta década de la vida, sin embargo la edad de comienzo de la enfermedad se sitúa entre la segunda y la tercera década, descendiendo notablemente la frecuencia a partir de esa edad. Asimismo, se ha referido un predominio en el sexo masculino sobre el femenino en una relación de 2-3:1 [KIM, 1998].

Son numerosos los estudios realizados para conocer la frecuencia real de la litiasis en la población general. La medida de la frecuencia puede expresarse en forma de prevalencia, es decir, el porcentaje de individuos que en el momento del estudio tienen o han tenido problemas litíasicos, o bien en forma de incidencia, es decir, los casos nuevos que a lo largo del estudio pasan de estar sanos a estar enfermos.

La litiasis urinaria tiene una prevalencia en España del 4.16 % [ROUSAUD, 1986], siendo en Mallorca del 14.3 % [GRASES, 1994], una de las tasas más altas a nivel de todo el estado español. Este hecho se agrava debido a que entre el 50 y 70 % de los litíasicos recidivan en un plazo de 5 años [LJUNGHALL, 1987; SCHNEIDER, 1985; SHOKEIR, 2001], debido a que en la mayoría de ocasiones, pese a la extracción o expulsión espontánea del cálculo, persiste la alteración urinaria causante de su formación. En la Unión Europea, el 12 % de la población sufrirá al menos un episodio relacionado con esta enfermedad a lo largo de su vida [SCHNEIDER, 1985], el mismo porcentaje que se ha estimado en varones de Estados Unidos [MOE, 2006a]. No obstante, la prevalencia de litiasis renal varía ostensiblemente entre distintos países o zonas geográficas;



así, en los países del tercer mundo está por debajo del 1 %, mientras que en los países más desarrollados comprende valores de entre el 4 y el 15 % [AKINCI, 1991; BORGHI, 1990; INDRIDASON, 2006; SCOTT, 1985; STAMATELOU, 2003].

La incidencia de la litiasis urinaria también varía considerablemente, en España obtenemos valores comprendidos entre 0.245-0.51 %, en EEUU entre 0.14-0.331 % y en el Reino Unido entre un 0.13-0.38 % [ALAPONT, 2001].

## 2. Mecanismos de formación de los cálculos

Un cálculo urinario es una estructura sólida que se forma en el tracto urinario superior (sólo excepcionalmente se forma en la vejiga urinaria) y que aparece en la orina a causa de las alteraciones en el balance físico-químico y/o urodinámico del sistema urinario, desde los túbulos colectores hasta la uretra. Puede tener un tamaño mínimo de 1 mm y está constituido básicamente por elementos cristalinos, de una manera menos frecuente por elementos amorfos orgánicos y/o inorgánicos, que pueden ser mixtos con sustancias no cristalinas de peso molecular alto [SCHNEIDER, 1982].

La urolitiasis se puede clasificar en varias formas clínicas dependiendo de la composición química y estructura de los urolitos [CIFUENTES, 1984]. La más frecuente de todas ellas en los países industrializados es la forma oxalocálcica, que representa el 60-70 % de todos los casos [AHLSTRAND, 1981; BIHL, 2001; DELVECCHIO, 2003; GOLFARB, 1999; GRIFFITH, 1981; LJUNGHALL, 1980; OTNES, 1983; ROBERTSON, 1984; URIBARRI, 1998]. La forma oxalocálcica puede presentar diferentes hidrataciones en los cálculos renales humanos [GRASES, 2002; KIM, 1982]:

- Monohidrato (COM), que pueden dividirse en: papilares (con un 12.9 % de todos los casos) o no papilares, también llamados de cavidad (16.4 %).
- Dihidrato (COD), con un 33.8 % de los casos, siendo el de mayor prevalencia y recurrencia [GRASES, 2003].
- Trihidrato (COT), hallados en muy pocas ocasiones debido a su inestabilidad termodinámica [TOMAZIC, 1980].

La transformación de los cálculos de COD y COT (termodinámicamente inestables) a COM es un proceso lento que para completarse necesita un tiempo del orden de cientos de horas [SKRTIC, 1987]. Los factores etiológicos que determinan el grado de hidratación que presentan los cálculos renales de oxalato cálcico son diferentes:

- Los cálculos de COM son más frecuentes en pacientes que tienen una excreción normal de calcio asociada a una carencia en la capacidad de inhibición de la cristalización [BERLAND, 1999; GRASES, 2002].
- Los cálculos de COD se forman en pacientes que presentan hipercalcemia, excreción correcta de citrato y pH urinario superior a 6 [ASPLIN, 1998; CONTE, 1990; GALÁN, 1996; PARENT, 1999; PIERRATOS, 1994].

Los cálculos renales pueden presentar otras composiciones [GRASES, 2002]:

- Cálculos de fosfato: hidroxapatita (HAP) con un 7.1 %; estruvita (fosfato amónico-magnésico) que son de origen infeccioso, con un 4.1 %; brushita con un 0.6 %. Se forman principalmente cuando el pH urinario es superior a 6.0 y cuando hay un déficit en la concentración de inhibidores.
- Cálculos de ácido úrico, con un 8.2 %; se forman principalmente cuando el paciente tiene el pH urinario inferior a 5.5 junto con hiperuricemia.
- Cálculos mixtos, que pueden ser de COD/HAP (11.2 %) o de oxalato cálcico/ácido úrico (2.6 %). Se dan cuando se combinan o se alternan los diferentes factores que determinan la formación de cada uno de ellos por separado.
- Cálculos de cistina, con un 1.1 %; se forman a causa de una alteración genética que afecta al metabolismo de este aminoácido.
- Cálculos poco frecuentes (1.9 %). Corresponden normalmente a cálculos medicamentosos (triamtereno, indinavir, sulfamidas,...).

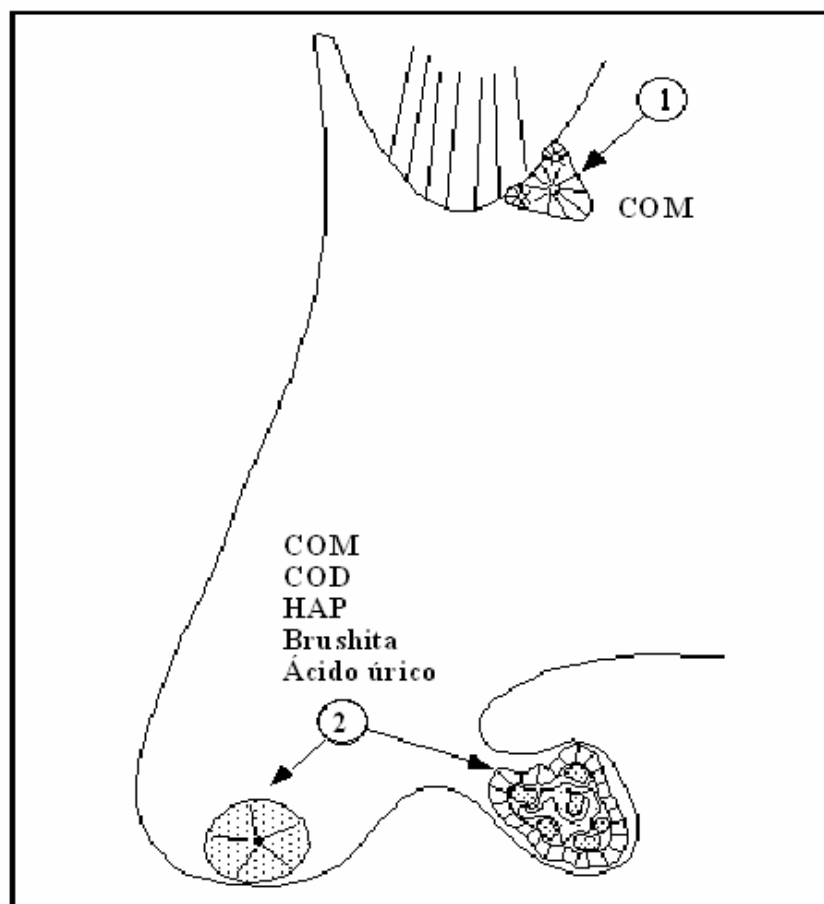
Cada uno de estos tipos de cálculos tiene un mecanismo de formación y una estructura diferente.

## 2.1. Mecanismo de formación y estructura de los cálculos de oxalato cálcico

Al igual que para cualquier tipo de cálculo, su formación tiene lugar como consecuencia de la desafortunada combinación de varios factores, según los cuales pueden considerarse dos grandes grupos de cálculos de oxalato cálcico como componente mayoritario: los de oxalato cálcico monohidrato (COM) y los de oxalato cálcico dihidrato (COD).

### 2.1.1. Oxalato cálcico monohidrato (Whewellita)

A su vez estos cálculos pueden ser divididos en dos grupos: los papilares que presentan un punto de unión detectable a la papila y los de cavidad que no lo presentan (Figura 1.1).



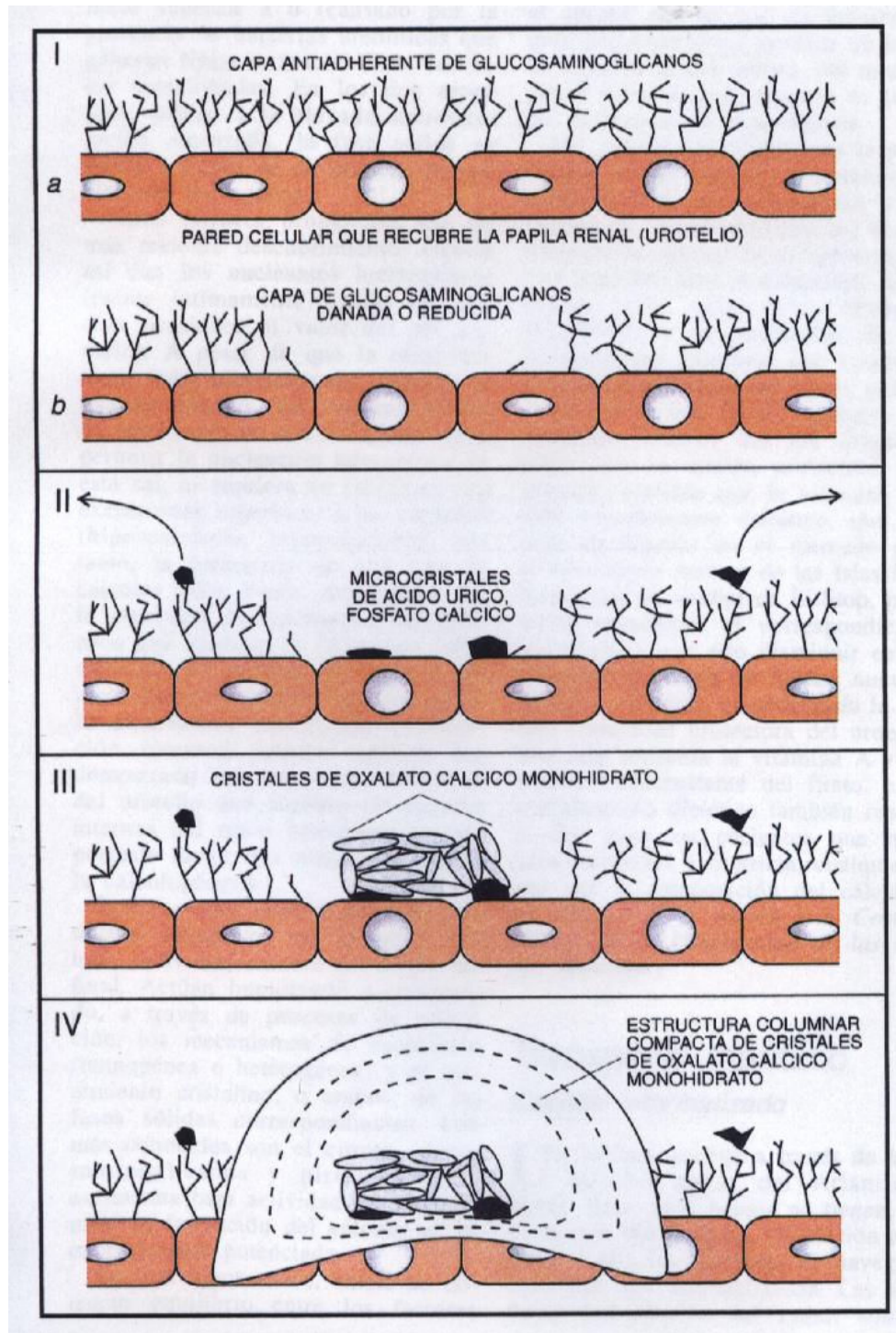
**Figura 1.1.-** Esquema general del mecanismo de formación de los cálculos renales: papilares (1); de cavidad (2).

### 2.1.1.1. Formación y estructura de los cálculos de COM papilares

Los cálculos de oxalato cálcico monohidrato (COM) papilares inician su formación sobre la papila renal sólo en zonas donde la capa antiadherente de GAGS que la recubre y protege está reducida o destruida como consecuencia de alguna disfunción celular o ataque externo [GEBHARDT, 1973; GILL, 1979; GILL, 1981; GILL, 1982; GRASES, 1993a; GRASES, 1999b; HIENZSCH, 1979; LIESKE, 1997; PIERAS, 2006; SEE, 1992; SÖHNEL, 1993a]. En la Figura 1.2 se puede ver su formación de forma esquemática. Si el daño y/o destrucción celular es considerable (por ejemplo, necrosis causada por analgésicos), el detritus orgánico generado puede actuar como inductor (nucleante heterogéneo) de los cristales de oxalato cálcico que de esta manera iniciarán el crecimiento del que será el futuro corazón o núcleo del cálculo. La capacidad del epitelio necrosado para actuar como nucleante heterogéneo del oxalato cálcico es en parte debida al incremento de la concentración de calcio que se produce durante la muerte celular [GRASES, 1996a].

Aunque la composición de la orina es idéntica en los dos riñones, estos cálculos se forman principalmente en uno y siempre el mismo riñón del enfermo [BRENNER, 1976]. De esta manera se demuestra que la propensión a la formación de cálculos papilares se encuentra más ligada al estado de los respectivos riñones que a la composición de la orina [GALÁN, 1996]. En general, las células renales epiteliales sufren alteraciones muy frecuentemente, por lo que continuamente presentan procesos de apoptosis y/o necrosis, iniciando así una cascada de acontecimientos que conducen a la formación de cristales, que al quedar anclados constituirán los gérmenes de los futuros cálculos [KHAN, 2004]. Estos hechos nos dan una idea de la importancia que tiene la capa antiadherente de GAGS en la prevención del desarrollo de concreciones sólidas sobre el urotelio [GILL, 1979; GRASES, 1996a; GRASES, 1996b; GRENAO, 1988; SEE, 1992].

Es importante tener en cuenta que, aun cuando cualquier orina está sobresaturada respecto al oxalato cálcico, las concentraciones normales de estas sustancias no son suficientes por sí mismas para inducir la formación de cristales de oxalato cálcico (nucleación homogénea) [BROWN, 1991; FINLAYSON, 1978a; FINLAYSON, 1978b; LIESKE, 1997], de forma que se necesita un núcleo previo, que tendrá diferente composición que el resto del cálculo. La nucleación homogénea sólo tiene lugar a partir de valores muy elevados de sobresaturación (exige un producto de concentraciones entre 80 y 100 veces mayor al valor de  $K_{ps}$  del oxalato cálcico) a los que las velocidades de nucleación son muy elevadas y los periodos de inducción muy breves (fracciones de segundo) [SARIG, 1973], hecho que no sucede en el caso de la litiasis oxalocálcica.



**Figura 1.2.-** Esquema del mecanismo de formación de los cálculos de COM papilares. Ia) Tejido epitelial sano (con capa antiadherente sana de GAGS recubriendo el epitelio de la papila). Ib) Tejido epitelial dañado o mal protegido (factor de riesgo litiasico). II) Aparición en estas zonas de microcristales de fosfatos cálcicos (pH urinario superior a 6.0), ácido úrico (pH urinario inferior a 5.5), detritus orgánicos,... que favorecen la formación sobre ellos de cristales de COM. III) El COM crece sobre el núcleo heterogéneo, comenzando la formación del cálculo. IV) En ausencia de una inhibición adecuada se acaba generando el cálculo de COM.

Cuando la destrucción o daño celular no es lo suficientemente considerable como para inducir la formación de cristales de oxalato cálcico, pueden existir otras sustancias que en condiciones adecuadas se depositen sobre las zonas débiles de la papila, actuando después como inductoras del crecimiento del oxalato cálcico. Entre estas sustancias se deben destacar:

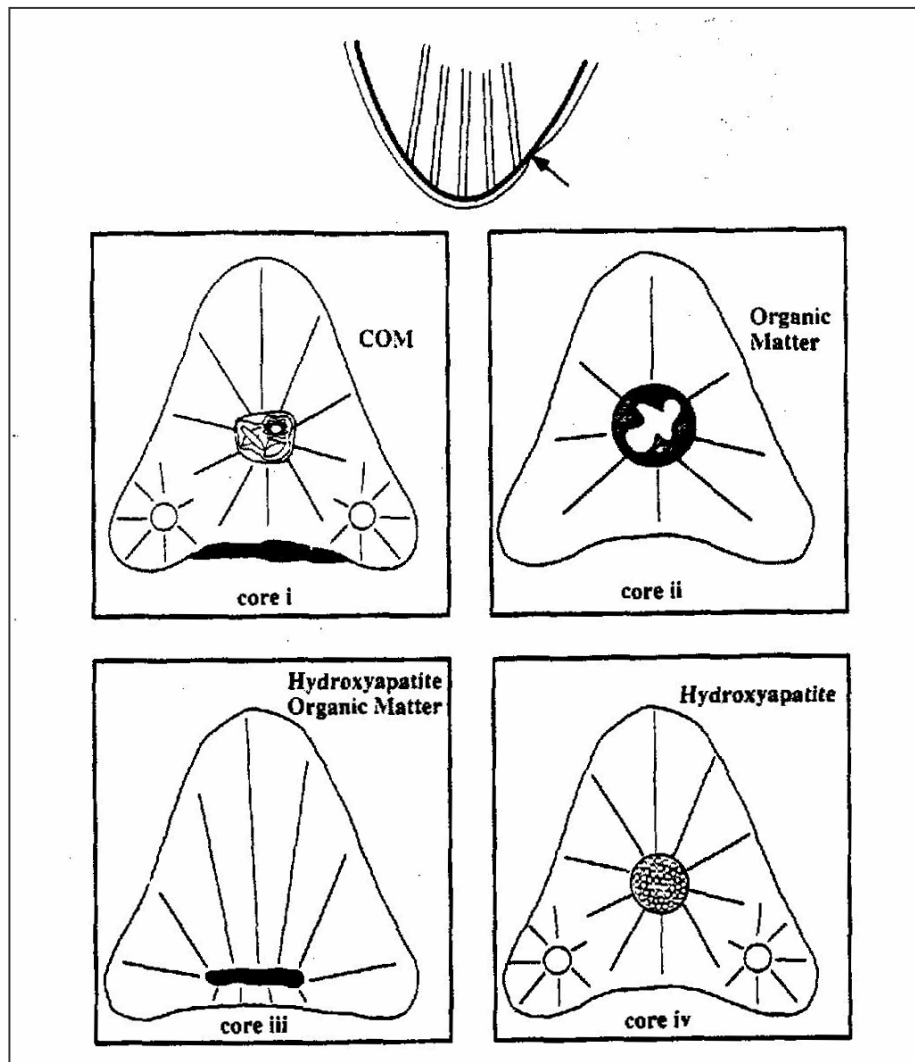
- Los fosfatos cálcicos (principalmente brushita e hidroxiapatita) para valores de pH urinario superiores a 6.0.
- El ácido úrico para valores de pH urinario inferiores a 5.5 [GRASES, 2006].
- Otras: mucina y otras glicoproteínas, GAGS, compuestos inorgánicos (carbonato cálcico, fluoruro cálcico,...), fármacos.

De esta manera se va constituyendo una pequeña agrupación desordenada del orden de 0.5 mm de cristales de oxalato cálcico, rodeados generalmente por una capa sin estructura de materia orgánica unida a la pared papilar que formará el llamado corazón del cálculo.

A partir de aquí, es prácticamente imposible parar el proceso puesto que sobre esta masa se inicia el crecimiento de cristales en dirección perpendicular a su superficie (zona columnar del cálculo), que más pronto o más tarde acabarán formando el cálculo. La zona columnar se encuentra parcialmente interrumpida por acumulaciones de materia orgánica, aproximadamente cada 100  $\mu\text{m}$  [IWATA, 1985; IWATA, 1992], materia que constituye alrededor del 2 % del cálculo.

La formación del corazón representa la primera y posiblemente la etapa más importante en el desarrollo del cálculo de COM papilar. Los cálculos frecuentemente contienen más de un corazón, sin embargo siempre se puede distinguir uno situado cerca de la región de unión con la papila, siendo éste el corazón alrededor del cual empieza el desarrollo del cálculo [GRASES, 1993b; SÖHNEL, 1993b]. Se han podido observar (Figura 1.3) cuatro estructuras diferentes del corazón primario [GRASES, 1998c].



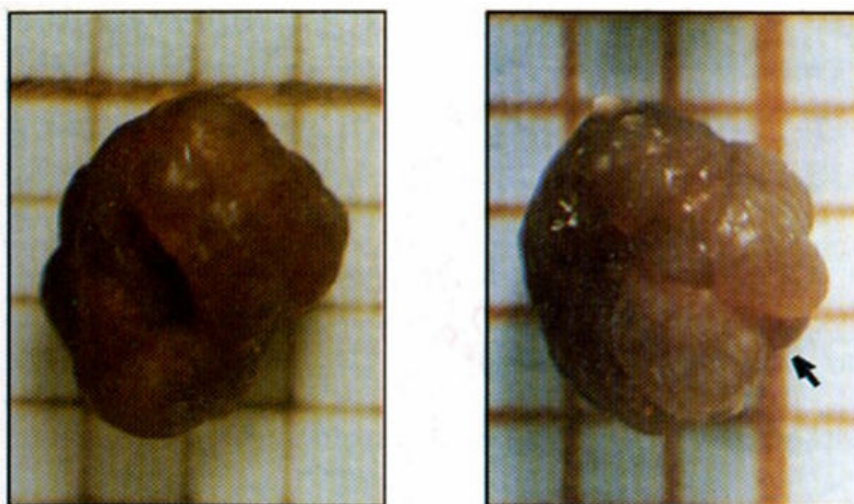


**Figura 1.3.-** Esquema de la estructura interna de los cálculos de COM papilares.

- (i) Formados por cristales de COM asociados y gemelos dispuestos libremente, adoptando una forma ovo-esférica. El centro del corazón normalmente suele ser la región con menor densidad de cristales, la cual aumenta gradualmente hacia sus extremos. Pueden presentar fragmentos de materia orgánica, pero en menor proporción que en el tipo de corazón (ii). La formación de estos tipos de corazones es fruto de la unión de una partícula (o partículas) al epitelio papilar.
- (ii) Formados por un corazón central vacío con materia orgánica a su alrededor. Su formación se puede explicar por la disminución o daño de la capa de GAGS que cubre el urotelio, formando un hemisferio. Las proteínas y los detritus orgánicos constituyen un sustrato efectivo para la nucleación de COM [GRASES, 1992].

- (iii) Formados por materia orgánica calcificada por hidroxiapatita (HAP) situado en el fondo del cálculo. Su formación se explica asumiendo la mineralización de una parte del epitelio papilar severamente dañado, donde encontramos frecuentemente una capa densa de materia orgánica que recubre esta parte lesionada.
- (iv) Corazón central de HAP y algunos fragmentos de materia orgánica adoptando forma ovo-esférica. Su formación se explica como consecuencia de la presencia de varias alteraciones en el epitelio renal, que en combinación con unas condiciones urinarias adecuadas para la cristalización de HAP ( $\text{pH} > 6$ , baja excreción urinaria de Mg,...) produce un depósito considerable de este material en el epitelio dañado.

En resumen, podríamos decir que para la formación de un cálculo de COM papilar es necesario el desarrollo de un germen integrado por partículas unidas a la papila; a partir de aquí, se formarán cristales de COM que constituirán el corazón del cálculo, cuyo desarrollo proseguirá a través del crecimiento columnar de cristales de COM, originando así el cuerpo principal del cálculo [GRASES, 1993c]. Muchos cálculos papilares presentan una forma típica, mostrando una zona cóncava que corresponde al punto de unión con la papila [CIFUENTES, 1987; GRASES, 1993c], como puede verse en la Figura 1.4.

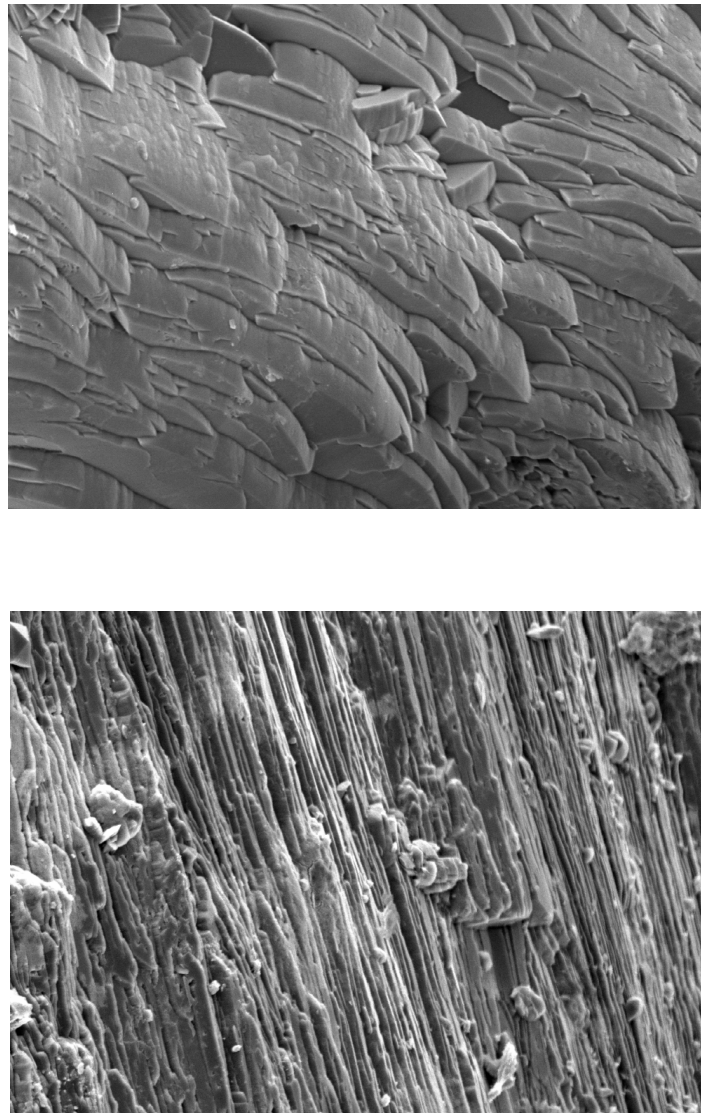


**Figura 1.4.-** Cálculos de COM papilares. La flecha indica el punto de unión con la papila.



#### 2.1.1.2. Formación y estructura de los cálculos de COM de cavidad (no papilares)

Los cálculos de COM de cavidad presentan, en general, una estructura interna totalmente diferenciada a la de los cálculos de COM papilares. Presentan una zona central ocupada por el nucleante heterogéneo responsable de su formación (materia orgánica, hidroxapatita, ácido úrico, restos medicamentosos, etc.). Sobre este corazón central, cuya retención en una cavidad renal permite que actúe como nucleante heterogéneo, crece el COM en estructura columnar que acabará constituyendo el correspondiente cálculo (Figura 1.5).



**Figura 1.5.-** Imágenes obtenidas con el microscopio electrónico de barrido (SEM) de cálculos de COM donde puede apreciarse el crecimiento de los cristales en estructura columnar.

Una zona del riñón con baja eficacia urodinámica (como pueda ser el cáliz renal inferior o una cavidad), contiene constantemente orina durante un tiempo de residencia que supera el valor promedio de residencia en el riñón en global.

Como ya hemos mencionado, las concentraciones urinarias de calcio y de oxalato no son suficientes para justificar la formación de los cristales de COM [BROWN, 1991; FINLAYSON, 1978a; FINLAYSON, 1978b], circunstancia que hace imprescindible la existencia de promotores (nucleantes heterogéneos) de dicha estructura cristalina. Los nucleantes heterogéneos pueden ser los mismos que en los cálculos de COM papilares (fosfatos cálcicos, ácido úrico, detritus,...). Por otra parte, los inhibidores de la cristalización pueden realizar una labor muy importante en la prevención del desarrollo del cálculo, de manera que su déficit constituye un factor de riesgo clave para dicho desarrollo. No obstante, es importante observar que en muchos casos la presencia de inhibidores de la cristalización no pueden detener completamente el desarrollo del cálculo [LIU, 1970].

### **2.1.2. Oxalato cálcico dihidrato (Wheddellita)**

La forma dihidratada es una fase termodinámicamente inestable del oxalato cálcico, que en disolución se transforma gradualmente en la forma estable monohidratada [NAKAI, 1996; SKRTIC, 1987]. Por tanto, los factores cinéticos son los que permiten explicar la formación de cristales de COD. Así, la presencia de hipercalcemia y/o hiperoxaluria, fuerza iónica elevada, cantidades notables de citrato y la presencia de coloides de fosfato cálcico a pH > 6.0 [GRASES, 1990] hacen que la formación de COD sea cinéticamente más favorable que la de COM.

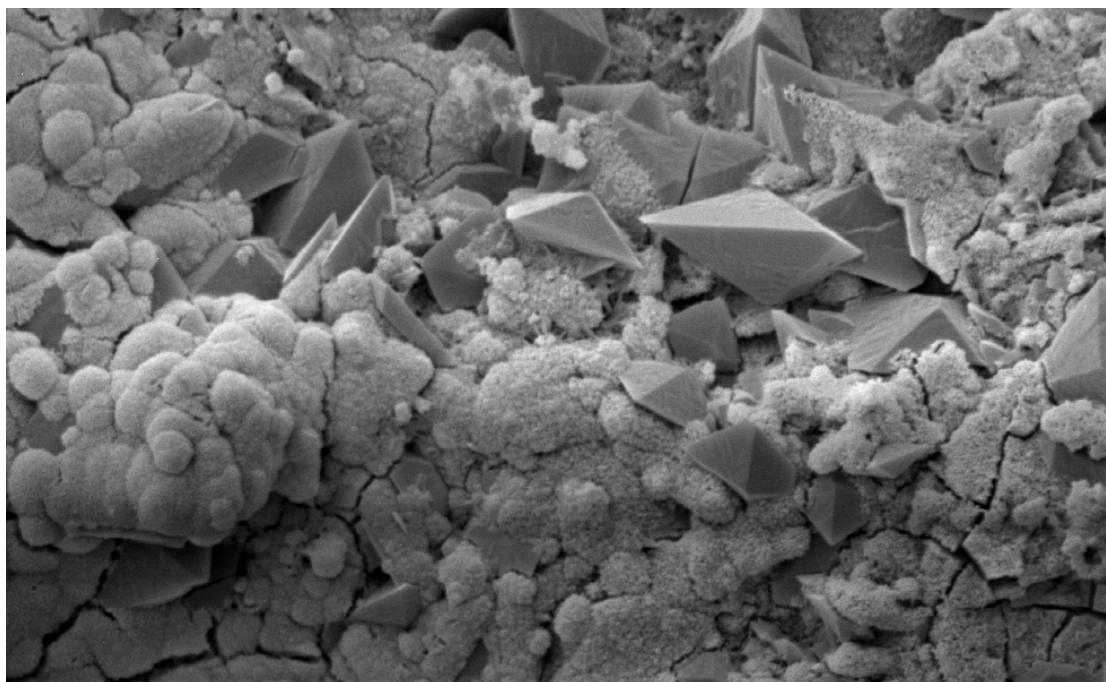
Generalmente son cálculos formados por cristales de COD (Figura 1.6) y cantidades variables de COM que proviene de la transformación de cristales de COD (su proporción dependerá del tiempo de residencia del cálculo en el organismo). También pueden presentar pequeñas cantidades de HAP distribuida de forma irregular o materia orgánica. Para la formación de estos cálculos se requiere la presencia de partículas sólidas (materia orgánica o HAP) en cavidades de baja eficacia urodinámica, que promoverán el desarrollo de cristales de COD debido a la composición particular de la orina.



**Figura 1.6.-** Imagen obtenida con el SEM de la superficie de un cálculo de COD donde pueden observarse los típicos cristales de COD piramidales.

## **2.2. Mecanismo de formación y estructura de los cálculos mixtos COD/HAP**

Tienen una composición análoga a los cálculos de COD, pero con cantidades más importantes de HAP y materia orgánica (Figura 1.7), que frecuentemente se disponen alternadamente formando capas diferenciadas. Suponen el 11.2 % de los casos [GRASES, 2002]. Las modificaciones en la dieta provocan cambios en la composición de la orina, que condicionan dicha existencia alternante de capas de HAP y COD [CIFUENTES, 1984]. Para formarse requieren también una cavidad de baja eficacia urodinámica, hipercalciuria y pH urinario superior a 6.0.



**Figura 1.7.-** Imagen obtenida con el SEM de la superficie de un cálculo mixto de COD y HAP, donde pueden apreciarse los cristales con estructura piramidal correspondiente al COD y los esferulitos de HAP.

### 2.3. Mecanismo de formación y estructura de los cálculos de fosfato

En los cálculos renales humanos se han encontrado, de forma mayoritaria o minoritaria, hasta 5 tipos de fosfatos: la hidroxiapatita (HAP)  $\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6$ , la brushita (BRU)  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , la estruvita (FAM)  $\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , carbonato de apatita  $\text{Ca}_{10}(\text{OH}, \text{CO}_3, \text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  y whitlockita (TCP)  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  [MURPHY, 1962; PRIEN, 1947], siendo las últimas dos composiciones más minoritarias.

La fase termodinámicamente estable en contacto con un sistema acuoso con calcio, fosfato y magnesio es la brushita a valores de pH inferiores a 5 y la HAP para valores de pH superiores a 5 [KEMENADE, 1987; NANCOLLAS, 1980]. En condiciones fisiológicas se ha observado la conversión de brushita a HAP [SPENCER, 1978], aunque también el caso inverso [PAK, 1981].

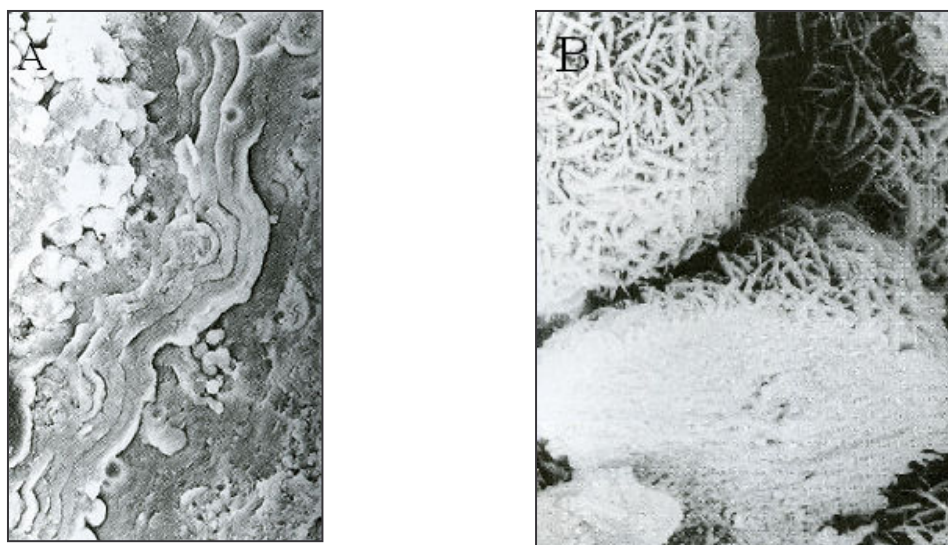
En general, podemos distinguir dos grandes grupos de cálculos que contienen fosfatos: los cálculos de fosfato cálcico propiamente dichos, formados principalmente por HAP o brushita y los cálculos infecciosos de estruvita (fosfato amónico-magnésico, FAM) [DAUDON, 1993].



### **2.3.1. Cálculos de hidroxiapatita (HAP)**

La formación de este tipo de cálculos requiere la existencia de cavidades de baja eficacia urodinámica, combinadas con valores de  $\text{pH} > 6$ , hipercalciuria e hipomagnesiuria [BUSHINSKY, 2000; GAULT, 1991; PARKS, 2004; PEACOCK, 2002]. En estas condiciones se generan en la orina microcristales de HAP que, juntamente con materia orgánica, van sedimentando en la cavidad. La entrada posterior de más material, unido al crecimiento de los cristales ya existentes, acaba generando el cálculo renal, el cual presentará una morfología externa que dependerá en gran medida de la morfología de la cavidad donde se haya formado.

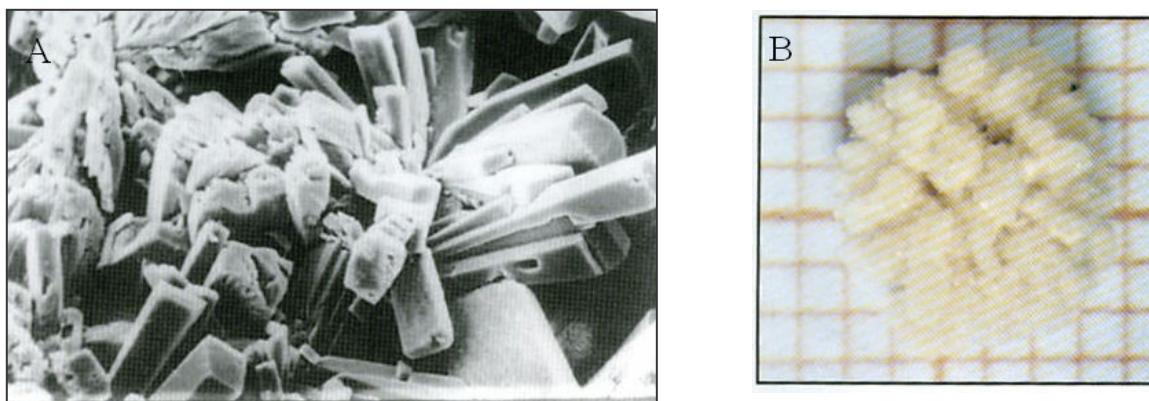
La estructura fina interior de estos cálculos se caracteriza por una sucesión de capas de material amorfo, las capas de HAP aspidínicas [CIFUENTES, 1984]. Macroscópicamente estas capas no presentan estructura; sin embargo, al observar con más detalle puede verse que están formadas por pequeñas esferas (esferulitos) de aproximadamente  $0.1\ \mu\text{m}$ , de material amorfo unido (Figura 1.8). Las esferas de HAP se acumulan en gran parte en las cavidades como entidades individuales o formando agregados de unos  $50\ \mu\text{m}$  de diámetro.



**Figura 1.8.-** Imágenes obtenidas con el microscopio electrónico de barrido (SEM). A) Detalle de la parte interna de un cálculo de HAP donde se observa la estructura con capas aspidínicas (aparentemente amorfas). B) Estudio detallado de la capa aspidínica donde se ve que está formada por esferulitos de tamaño muy pequeño.

### **2.3.2. Cálculos de brushita (BRU)**

Como en el caso anterior, la formación de este tipo de cálculo también necesita la existencia de cavidades de baja eficacia urodinámica. Sin embargo, la brushita se forma en aquellas situaciones en que el pH urinario oscila entre 6 y 7, las concentraciones urinarias de magnesio suelen ser normales y frecuentemente se detecta déficit de inhibidores [GRASES, 1996c]. En estas condiciones se pueden formar simultáneamente cristales de BRU y HAP. La génesis de los cristales de BRU es lenta (debido a los valores de sobresaturación), llegando a tamaños considerables, de forma que pueden crecer paralelamente formando empalizadas (Figura 1.9.A).



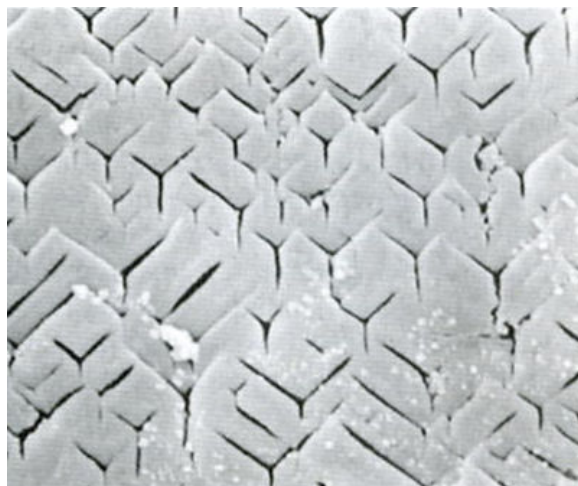
**Figura 1.9.-** A) Imagen obtenida con el SEM de cristales de brushita típicos. B) Cálculo real de brushita.

Los cálculos de brushita no son compactos, sino que pueden contener cavidades parcialmente ocupadas por partículas de HAP y materia orgánica. Los cristales de brushita se pueden encontrar dispuestos de forma radial en formaciones más grandes, las cuales están separadas por fisuras laterales microscópicas; cristalizan en sistema monoclinico. En general, estos cálculos son relativamente pequeños, de forma redondeada y no presentan ningún hueco en el centro (Figura 1.9.B).

### **2.3.3. Cálculos de estruvita (FAM)**

Estos cálculos tienen como componente mayoritario la estruvita (20 - 60 %), que es fosfato amónico-magnésico (FAM). Son cálculos infecciosos. La infección bacteriana del tracto urinario suele ser la causa más común de este tipo de litiasis. Los gérmenes ureolíticos (*Proteus*, *Klebsiellas*, *Pseudomonas*,...) normalmente provocan un notable aumento del pH urinario ( $\text{pH} > 7$ ) y de la concentración urinaria de amonio, cambios que favorecen la precipitación del FAM y de la HAP [RIEU, 2005]. La masa cristalina formada, unida con detritus orgánicos (residuos celulares, bacterias, mucoproteínas,...) pueden formar depósitos que se acabarán convirtiendo en cálculos.

Los cálculos infecciosos no tienen una estructura interna regular. En general, tienen un tamaño grande y son coraliformes [HEILBERG, 2006]. Los cristales de estruvita bien desarrollados pueden llegar a las 100  $\mu\text{m}$  y se diseminan a través del volumen del cálculo, presentando en su superficie una estructura identificativa en forma de Y (Figura 1.10). Estos cálculos, además de FAM, también tienen HAP y materia orgánica, la cual se encuentra distribuida irregularmente dentro del cálculo.



**Figura 1.10.-** Imagen obtenida con el SEM de la superficie de un cristal de FAM, donde se puede observar la estructura típica en “Y” que presentan las caras de estos cristales.

## 2.4. Mecanismo de formación y estructura de los cálculos de ácido úrico

Los factores más importantes en la formación de estos tipos de cálculos son la excreción de grandes cantidades de ácido úrico y el  $\text{pH} < 5.5$ , siendo este último el más determinante [MOE, 2006b]. La baja excreción de amonio y peso elevado de los pacientes son dos de los factores que pueden explicar los bajos valores de  $\text{pH}$  que presentan [MAALOUF, 2004; SAKHAEI, 2002]. Entre otras causas que favorecen la formación de este tipo de cálculos destaca la existencia de cavidades de baja eficacia urodinámica que facilitan la sedimentación y el crecimiento de cristales de ácido úrico. Por otra parte, los inhibidores de la cristalización pueden jugar un papel importante, retardando o ralentizando el proceso de formación.

El ácido úrico es el principal producto final del metabolismo de las purinas en humanos. El hígado del hombre no posee la uricasa, la enzima necesaria para su metabolismo y eliminación urinaria. El ácido úrico que se encuentra en los cálculos renales no se encuentra siempre en la misma forma química, pudiendo estar: en la forma anhidra (termodinámicamente estable), en la forma dihidratada (se forma a elevadas sobresaturaciones) o en una mezcla de ambas [BABIC-IVANCIC, 1987; GRASES, 2000b]. Sin embargo, la forma dihidratada es una fase muy inestable, de manera que pierde con mucha facilidad el agua de cristalización, transformándose en anhidra generando así estructuras frágiles, con fisuras y grietas [HESSE, 1975; HESSE, 1979]. Los cálculos de ácido úrico tienen una alta incidencia de recidiva.

Es muy frecuente detectar cristales de oxalato cálcico (casi siempre monohidrato) entre los cristales de ácido úrico, confirmando así la capacidad que presentan los cristales de ácido úrico para actuar como nucleantes heterogéneos del oxalato cálcico.

## 2.5. Mecanismo de formación y estructura de los cálculos de cistina

La cistina es un aminoácido dibásico muy poco soluble en agua a valores de  $\text{pH}$  ácido. Por este motivo, cuando tiene lugar una eliminación urinaria elevada de cistina juntamente con un  $\text{pH}$  ácido ( $\text{pH} < 5-5.3$ ), esta sustancia alcanza valores elevados de sobresaturación, por lo que precipita y puede acabar formando un cálculo.



Como ya se ha comentado, los cálculos de cistina representan el 1.1 % de los cálculos urinarios, sin embargo pueden llegar a representar el 6-8 % de los cálculos en edad pediátrica.

La cistinuria (eliminación urinaria elevada de cistina) se debe a un trastorno hereditario (de carácter autosómico recesivo) en el transporte intestinal y reabsorción tubular renal proximal de los aminoácidos dibásicos cistina, lisina, arginina y ornitina, estando localizado el gen responsable en el cromosoma 2p [PRAS, 1994; SHEKARRIZ, 2002].

Este tipo de cálculo se forma como consecuencia de procesos combinados de sedimentación y crecimiento cristalino. Un 30 % de los formadores de cálculos de cistina pueden hacer cálculos mixtos de cistina y ácido úrico.

### 2.6. Mecanismo de formación y estructura de cálculos poco frecuentes

La ingesta abundante y constante de algunos productos (como fármacos) puede acabar generando cálculos a través de alguno de los mecanismos ya descritos. Así, una elevada excreción del fármaco y/o sus metabolitos, una baja solubilidad del mismo, cambios en el volumen de orina, en el pH, así como la duración del tratamiento puede jugar un papel fundamental en el incremento de la saturación del fármaco en la orina o pueden producir un descenso de los factores que inhiben la formación de dichos cálculos, lo que finalmente tendrá como resultado su desarrollo. Entre los más frecuentes cabe destacar los formados por triamtereno, sílice, indinavir, sulfamidas, etc.

El triamtereno es un diurético que se usa en asociación con furosemina, en el tratamiento de la hipertensión arterial y de los edemas de cualquier etiología, presentando una incidencia de formación de cálculos muy baja.

Los cálculos de sílice (dióxido de silicio o  $\text{SiO}_2$ ) se han relacionado en cuanto a su etiología con la ingesta crónica de fármacos antiácidos, especialmente en aquellos que contienen trisilicato de magnesio. La formación de sílice en orina estaría facilitada y condicionada a la presencia de valores de pH ácidos [CRUZ, 2000].

Otro fármaco que puede dar origen a la formación de cálculos renales es el Indinavir [DIELEMAN, 2001; HORTIN, 2000]. El Indinavir es el fármaco más usado en el tratamiento de pacientes afectos por el Virus de la Inmunodeficiencia Adquirida (HIV), apareciendo problemas

litiásicos en torno a un 10-20 % de los pacientes que lo toman [BLAKE, 1998; KALAITZIS, 2002; SCHWARTZ, 1999; TRAINOR, 1998].

El Indinavir es metabolizado por el hígado, y eliminado en un 81 % por las heces y en un 19 % por la orina (el 10-12 % de forma inalterada). El sulfato de Indinavir tiene una baja solubilidad en la orina a pH fisiológico, por lo que precipita y cristaliza en forma de “cristales de monohidrato de indinavir”. La eliminación de Indinavir puede actuar también como sustrato, permitiendo la nucleación heterogénea de cálculos mixtos de oxalato cálcico [BRUCE, 1997]. Sin embargo se ha demostrado que el Indinavir precipita con menor facilidad en orinas sintéticas a pH inferior a 6.0 [GRASES, 1999c] y en presencia de escina [GRASES, 2004].

Otros cálculos muy poco frecuentes pero de origen no farmacológico son los de carbonato cálcico (que sin embargo, son frecuentes en animales rumiantes) y los de urato cálcico. Algunos autores han descrito cálculos cuya composición mayoritaria era Silicio sin que los pacientes tomaran fármacos que lo contuvieran [ICHIYANAGI, 1998; NISHIKAWA, 1991; YAMAMOTO 1990]. Se ha descrito también un caso en que el componente mayoritario era sulfato cálcico dihidrato [CIFUENTES, 1983].

También vale la pena resaltar la formación de cálculos compuestos por purinas como la Xantina [PAIS, 2006] o la Dihidroxyadenina, que normalmente se originan debido a anomalías metabólicas hereditarias.

Se han encontrado cálculos desarrollados alrededor de cuerpos extraños (grapas metálicas, puntos de sutura,...); su composición es mayoritariamente FAM o carbonato apatita.

## BIBLIOGRAFÍA

- [AHLSTRAND, 1981] Ahlstrand C, Tiselius HG (1981) Renal stone disease in a Swedish district during one year. *Scand J Urol Nephrol* **15**, 143-146.
- [AKINCI, 1991] Akinci M, Esen T, Tellaloglu S (1991) Urinary stone disease in Turkey: an updated epidemiological study. *Eur Urol* **20**, 200-203.
- [ALAPONT, 2001] Alapont FM, Gálvez J, Varea J, Colome G, Olaso A, Sánchez JR (2001) Epidemiología de la litiasis urinaria. *Actas Urol Esp* **25**, 341-349.
- [ASPLIN, 1998] Asplin JR, Lingeman J, Kahnoski R, Mardis H, Parks JH, Coe FL (1998) Metabolic urinary correlates of calcium oxalate dehydrate in renal stones. *J Urol* **159**, 664-668.
- [BABIC-IVANCIC, 1987] Babic-Ivancic V, Furedi-Milhofer, Brown WE, Gregory TM (1987) Precipitation diagrams and solubility of uric acid dihydrate. *J Cryst Growth* **83**, 581-587.
- [BALAJI, 1997] Balaji KC, Menon M (1997) Mechanism of stone formation. *Urol Clin North Am* **24**, 1-11.
- [BERLAND, 1999] Berland Y (1999) Idiopathic calcium oxalate urinary lithiasis: new physiopathological approaches. *Nephrologie* **20**, 363-369.
- [BIHL, 2001] Bihl G, Meyers A (2001) Recurrent renal stone disease-advances in pathogenesis and clinical management. *Lancet* **358**, 651-656.
- [BLAKE, 1998] Blake SP, McNicholas MM, Raptopoulos V (1998) Nonopaque crystal deposition causing ureteric obstruction in patients with HIV undergoing indinavir therapy. *AJR J Roentgenol* **17**, 717-720.
- [BORGHI, 1990] Borghi L, Ferreti PP, Elia GF, Amato F, Melloni E, Traspasi MR, Novarini A (1990) Epidemiological study of urinary tract stones in a Northern Italian City. *Br J Urol* **65**, 231-235.
- [BRENNER, 1976] Brenner BM, Rector FC (1976) The Kidney (Saunders WB eds.) Philadelphia.

- [BROWN, 1991] Brown CM, Ackermann DK, Purich DL, Finlayson B (1991) Nucleation of calcium oxalate monohydrate: use of turbidity measurements and computer-assisted simulations in characterizing early events in crystal formation. *J Cryst Growth* **108**, 455-464.
- [BRUCE, 1997] Bruce RG, Munch LC, Hoven AD, Jerauld RS, Greenburg R, Porter WH, Rutter PW (1997) Urolithiasis associated with the protease inhibitor indinavir. *Urology* **50**, 513-518.
- [BUSHINKY, 2000] Bushinsky DA, Parker WR, Asplin JR (2000) Calcium phosphate supersaturation regulates stone formation in genetic hypercalciuric stone-forming rats. *Kidney Int* **57**, 550-560.
- [CERINI, 1999] Cerini C, Geider S, Dussol B, Hennequin C, Daudon M, Veessler S, Nitsche S, Boistelle R, Berthezene P, Dupuy P, Vazi A, Berland Y, Dagorn JC, Verdier JM (1999) Nucleation of calcium oxalate crystals by albumin: involvement in the prevention of stone formation. *Kidney Int* **55**, 1776-1786.
- [CHANDHOKE, 1999] Chandhoke PS, Fan J, May DJ, Yagisawa T (1999) Role of the renal collecting system in initial kidney stone formation. *J Endourol* **13**, 601-604.
- [CIFUENTES, 1983] Cifuentes LD, Medina JA, Traba ML (1983) A calcium sulfate calculus of renal origin. A verifiable observation? *Arch Esp Urol* **36**, 117-123.
- [CIFUENTES, 1984] Cifuentes LD (1984) Composición y estructura de los cálculos renales (Salvat ed) Barcelona.
- [CIFUENTES, 1987] Cifuentes L, Miñon J, Medina JA (1987) New studies on papillary calculi. *J Urol* **137**, 1024-1029.
- [COE, 1997] Coe FL, Parks JH (1997) New insights into the pathophysiology and treatment of nephrolithiasis: new research values. *J Bone Min Res* **12**, 522-533.
- [COE, 2005] Coe FL, Evan A, Worcester E (2005) Kidney stone disease. *J Clin Invest* **115**, 2598-2608.

- [CONTE, 1990] Conte A, Genestar C, Grases F (1990) Relation between calcium oxalate hydrate form found in renal calculi and some urinary parameters. *Urol Int* **45**, 25-27.
- [CRUZ, 2000] Cruz NA, Gómez-García MA, Lovaco F, Saez JC, García-Cuerpo E, Escudero A (2000) Litiasis urinaria de sílice: aportación de un nuevo caso. *Actas Urol Res* **24**, 202-204.
- [DAUDON, 1993] Daudon M, Bader CA, Jungers P (1993) Urinary calculi: review of classification methods and correlations with etiology. *Scanning Microscopy* **7**, 1081-1106.
- [DELVECCHIO, 2003] Delvecchio FC, Preminger GM (2003) Medical management of stone disease. *Curr Opin Urol* **13**, 229-233.
- [DIELEMAN, 2001] Dieleman JP, Salahuddin S, Hsu YS, Burger DM, Gyssens IC, Sturkenboom MC, Stricker BH, Kok DJ (2001) Indinavir crystallization around the loop of Henle: experimental evidence. *J Acquir Immune Defic Syndr* **28**, 9-13.
- [FASSANO, 2001] Fassano JM, Khan SR (2001) Intratubular crystallization of calcium oxalate in the presence of membranes vesicles: an in vitro study. *Kidney Int* **59**, 169-178.
- [FINLAYSON, 1978a] Finlayson B (1978) Physicochemical aspects of urolithiasis. *Kidney Int* **13**, 344-360.
- [FINLAYSON, 1978b] Finlayson B, Reid F (1978) The expectation of free and fixed particles in urinary stone disease. *Invest Urol* **15**, 442-448.
- [FLEISCH, 1978] Fleisch H (1978) Inhibitors and promoters of stone formation. *Kidney Int* **13**, 361-371.
- [GALÁN, 1996] Galán JA, Conte A, Llobera A, Costa-Bauzá A, Grases F (1996) A comparative study between etiological factors of calcium oxalate monohydrate and calcium oxalate dihydrate urolithiasis. *Urol Int* **56**, 79-85.

- [GAULT, 1991] Gault MH, Chafe LL, Morgan JM, Parfrey PS, Harnett JD, Walsh EA, Prabhakaran VM, Dow D, Colpitts A (1991) Comparison of patients with idiopathic calcium phosphate and calcium oxalate stones. *Medicine (Baltimore)* **70**, 345-359.
- [GEBHARDT, 1973] Gebhardt M (1973) Über biokristallisation und epitaxie. *J Crystal Growth* **20**, 6-12.
- [GILL, 1979] Gill WB, Ruggiero KJ, Straus FH (1979) Crystallization studies in a urothelial-lined living test tube (the catheterized female rat bladder).I. Calcium oxalate crystal adhesion to the chemically injured rat bladder. *Invest Urol* **17**, 257-261.
- [GILL, 1981] Gill WB, Jones KW, Ruggiero KJ, Fromes MC (1981) Calcium oxalate crystallization in urothelial-lined systems. En: Urolithiasis: clinical and basic research (Smith LH, Robertson WG, Finlayson B, eds.) pp 497-508, Plenum Press, New York.
- [GILL, 1982] Gill WB, Jones KW, Ruggiero KJ (1982) Protective effects of heparin and other sulfated glycosaminoglycans on crystal adhesion to injured uro-thelium. *J Urol* **127**, 152-154.
- [GOLDFARB, 1999] Goldfarb DS, Coe FL (1999) Prevention of recurrent nephrolithiasis. *Am Fam Physician* **15**, 2269-2278.
- [GRASES, 1990] Grases F, Millán A, Conte A (1990) Production of calcium oxalate monohydrate, dihydrate or trihydrate. A comparative study. *Urol Res* **18**, 17-20.
- [GRASES, 1992] Grases F, Masárová L, Söhnel O, Costa-Bauzá A (1992) Agglomeration of calcium oxalate monohydrate in synthetic urine. *Br J Urol* **70**, 240-246.
- [GRASES, 1993a] Grases F, Costa-Bauzá A, March JG, Söhnel O (1993) Artificial simulation of renal stone formation. *Nephron* **65**, 77-81.
- [GRASES, 1993b] Grases F, March JG, Conte A, Costa-Bauzá A (1993) New aspects on the composition structure and origin of the calcium oxalate monohydrate calculi. *Eur Urol* **24**, 381-386.

- [GRASES, 1993c] Grases F, Costa-Bauzá A, Conte A (1993) Studies on structure of calcium oxalate monohydrate renal papillary calculi. Mechanism of formation. *Scanning Microscopy* **7**, 1067-1074.
- [GRASES, 1994] Grases F, Conte A, March JG, Genestar C, Costa-Bauzá A, Martin M, Vallescar R (1994) Epidemiology of urinary stone disease in the Balearic Islands Community. *Int Urol Nephrol* **26**, 145-150.
- [GRASES, 1996a] Grases F, García-Ferragut L, Costa-Bauzá A (1996) Study of the early stages of renal stone formation: experimental model using urothelium of pig urinary bladder. *Urol Res* **24**, 305-311.
- [GRASES, 1996b] Grases F, García-Ferragut L, Costa-Bauzá A, March JG (1996) Study of the effects of different substances on the early stages of papillary stone formation. *Nephron* **73**, 561-568.
- [GRASES, 1996c] Grases F, Söhnle O, Villacampa AI, March JG (1996) Phosphates precipitating from artificial urine and fine structure of phosphate renal calculi. *Clin Chim Acta* **244**, 45-67.
- [GRASES, 1997] Grases F, Villacampa AI, Söhnle O, Königsberger E, May PM (1997) Phosphate composition of precipitates from urine-like liquors. *Cryst Res Technol* **32**, 707-715.
- [GRASES, 1998a] Grases F, Llobera A (1998) Experimental model to study sedimentary kidney stones. *Micron* **29**, 105-111.
- [GRASES, 1998b] Grases F, García-Ferragut L, Costa-Bauzá A (1998) Development of calcium oxalate crystals on urothelium: effect of free radicals. *Nephron* **78**, 296-301.
- [GRASES, 1998c] Grases F, Costa-Bauzá A, García-Ferragut L (1998) Biopathological crystallization: a general view about the mechanisms of renal stone formation. *Adv Colloid Interface Sci* **74**, 169-194.
- [GRASES, 1999a] Grases F, Costa-Bauzá A (1999) Phytate (IP6) is a powerful agent for preventing calcifications in biological fluids: usefulness in renal lithiasis treatment. *Anticancer Res* **19**, 3717-3722.

- [GRASES, 1999b] Grases F, Söhnle O, Costa-Bauzá A (1999) Renal stone formation and development. *Int Urol Nephrol* **31**, 591-600.
- [GRASES, 1999c] Grases F, Costa-Bauzá A, García González R, Payeras A, Bassa A, Torres JJ, Conte A (1999) Indinavir crystallization and urolithiasis. *Int Urol Nephrol* **31**, 23-29.
- [GRASES, 2000a] Grases F, Costa-Bauzá A, Königsberger E, Königsberger LC (2000) Kinetic versus thermodynamic factors in calcium renal lithiasis. *Int Urol Nephrol* **32**, 19-27.
- [GRASES, 2000b] Grases F, Villacampa AI, Costa-Bauzá A, Söhnle O (2000) Uric acid calculi: types, etiology and mechanisms of formation. *Clin Chim Acta* **302**, 89-104.
- [GRASES, 2002] Grases F, Costa-Bauzá A, Ramis M, Montesinos V, Conte A (2002) Simple classification of renal calculi closely related to their micromorphology and etiology. *Clin Chim Acta* **322**, 29-36.
- [GRASES, 2003] Grases F, Costa-Bauzá A, Ramis M, Montesinos V, Conte A (2003) Recurrence of renal lithiasis. *Scand J Urol Nephrol* **37**, 482-486.
- [GRASES, 2004] Grases F, García-González R, Redondo E, Costa-Bauzá A, Simonet BM, Sartini RP, Bassa A, Gallegos C, Payeras A, Saro D, Martínez AI, Cifuentes C, Homar F, Murillo JA, Fernández C, Riera M, Conte A (2004) Effects of escin on Indinavir crystallization time in the urine of patients with HIV-I infection: a multicenter, randomized, open-label, controlled, four-period crossover Trial. *Clin Ther* **26**, 2045-2055.
- [GRASES, 2006] Grases F, Sanchis P, Perelló J, Costa-Bauzá (2006) Role of uric acid in different types of calcium oxalate renal calculi. *Int J Urol* **13**, 252-256.
- [GRENABO, 1988] Grenabo L, Hedelin H, Hugosson J, Pettersson S (1988) Adherence of urease-induced crystals to rat bladder epithelium following acute infection with different uropathogenic microorganisms. *J Urol* **140**, 428-430.
- [GRIFFITH, 1981] Griffith, DP (1981) Urolithiasis. *J Urol* **126**, 431.



- [HEILBERG, 2006] Heilberg IP, Schor N (2006) Renal stone disease: causes, evaluation and medical treatment. *Arq Bras Endocrinol Metab* **50**, 823-831.
- [HESSE, 1975] Hesse A, Schneider HJ, Berg W, Hienzsche E (1975) Uric acid dihydrate as urinary calculus component. *Invest Urol* **12**, 405-409.
- [HESSE, 1979] Hesse A, Berg W, Bothor C (1979) Scanning electron microscopic investigations on the morphology and phase conversions of uroliths. *Int Urol Nephrol* **11**, 11-20.
- [HIENZSCH, 1979] Hienzsche E, Hesse A, Bothor C, Berg W, Roth J (1979) A contribution to the formation mechanism of calcium oxalate urinary calculi. IV. Experimental investigations of the intravenous crystallization of calcium oxalate in rabbit. *Urol Res* **7**, 223-226.
- [HORTIN, 2000] Hortin GL, King C, Miller KD, Kopp JB (2000) Detection of indinavir crystals in urine: dependence of method of analysis. *Arch Pathol Lab Med* **124**, 246-250.
- [ICHIYANAGI, 1998] Ichiyanagi O, Sasagawa I, Adachi Y, Suzuki H, Kubota Y, Nakada T (1998) Silica urolithiasis without magnesium trisilicate intake. *Urol Int* **61**, 39-42.
- [INDRIDASON, 2006] Indridason OS, Birgisson S, Edvardsson VO, Sigvaldason N, Palsson R (2006) Epidemiology of kidney stones in Iceland: a population-based study. *Scand J Urol Nephrol* **40**, 215-220.
- [IWATA, 1985] Iwata H, Nishio S, Wakatsuki A, Ochi K, Takeuchi M (1985) Architecture of calcium oxalate monohydrate urinary calculi. *J Urol* **133**, 334-338.
- [IWATA, 1992] Iwata H, Iio S, Nishio S, Takeuchi M (1992) Architecture of mixed calcium oxalate dihydrate and monohydrate stones. *Scanning Microsc* **6**, 231-238.
- [KALAITZIS, 2002] Kalaitzis C, Dimitriadis G, Tsalidis T, Kuntz R, Touloupidis S, Kelidis G (2002) Treatment of indinavir sulfate induced urolithiasis in HIV-positive patients. *Int Urol Nephrol* **34**, 13-15.

- [KEMENADE, 1987] Kemenade MJJM van, Bruyn PL (1987) A kinetic study of precipitation from supersaturated calcium phosphate solutions. *J Colloid Interface Sci* **118**, 564-585.
- [KHAN, 1995] Khan SR (1995) Heterogeneous nucleation of calcium oxalate crystals in mammalian urine. *Scanning Microsc* **9**, 597-614.
- [KHAN, 1997] Khan SR (1997) Calcium phosphate/calcium oxalate crystal association in urinary stones: implications for heterogeneous nucleation of calcium oxalate. *J Urol* **157**, 376-383.
- [KHAN, 2002] Khan SR, Glenton PA, Backov R, Talham DR (2002) Presence of lipids in urine, crystals and stones: implications for the formation of kidney stones. *Kidney Int* **62**, 2062-2072.
- [KHAN, 2004] Khan SR (2004) Role of renal epithelial cells in the initiation of calcium oxalate stones. *Nephron Exp Nephrol* **98**, 55-60.
- [KIM, 1982] Kim KM (1982) The stones. *Scanning Electron Microsc* **4**, 1635-1660.
- [KIM, 1998] Kim SC, Moon YT, Hong YP, Hwang TK, Coi SH, Kim KJ, Sul CK, Park TC, Kim YG, Park KS (1998) Prevalence and risk factors of urinary stone in Korean. *J Korean Med Sci* **13**, 138-146.
- [KONYA, 2003] Konya E, Umekawa T, Iguchi M, Kurita T (2003) The role of osteopontin on calcium oxalate crystal formation. *Eur Urol* **43**, 564-571.
- [LANCINA, 1999] Lancina JA (1999) Evaluación metabólicomineral del paciente con litiasis urinaria. En: Litiasis Urinaria (Ruiz Marcellán FJ) pp 71-80, Garsi SA, Madrid.
- [LIESKE, 1996] Lieske J, Coe F (1996) Urinary inhibitors and renal stone formation. En: Kidney Stones: Medical and Surgical Management (Coe F, Favus M, Pak C, Parks J, Preminger G) Lippincot-Raven P, Philadelphia.
- [LIESKE, 1997] Lieske JC, Norris R, Swift H, Toback FG (1997) Adhesion, internalization and metabolism of calcium oxalate monohydrate crystals by renal epithelial cells. *Kidney Int* **52**, 1291-1301.

- [LIESKE, 1998] Lieske JC, Toback FG, Deganello S (1998) Direct nucleation of calcium oxalate dehydrate crystals onto the surface of living renal epithelial cells in culture. *Kidney Int* **54**, 796-803.
- [LIU, 1970] Liu ST, Nancollas GH (1970) Kinetics of crystal growth of calcium sulfate dihydrate. *J Cryst Growth* **6**, 281-289.
- [LJUNGHALL, 1980] Ljunghall S, Backman U, Danielson BG, Fellstrom B, Johansson G, Wikstrom B (1980) Epidemiological aspects of renal stone disease in Scandinavia. *Scand J Urol Nephrol Suppl* **53**, 31-38.
- [LJUNGHALL, 1987] Ljunghall S (1987) Incidence of upper urinary tract stones. *Minner Electrolyte Metab* **13**, 220-227.
- [MAALOUF, 2004] Maalouf NM, Sakhaee K, Parks JH, Coe FL, Adams-Huet B, Pak CY (2004) Association of urinary pH with body weight in nephrolithiasis. *Kidney Int* **65**, 1422-1425.
- [MANDEL, 1996] Mandel N (1996) Mechanism of stone formation. *Semin Nephrol* **16**, 364-374.
- [MOE, 2006a] Moe OW (2006) Kidney stones: pathophysiology and medical management. *Lancet* **367**, 333-344.
- [MOE, 2006b] Moe OW (2006) Uric acid nephrolithiasis: proton titration of an essential molecule? *Curr Opin Nephrol Hyperten* **15**, 366-373.
- [MURPHY, 1962] Murphy BT, Pyrah LN (1962) The composition, structure, and mechanisms of the formation of urinary calculi. *Br J Urol* **34**, 129-159.
- [NAKAI, 1996] Nakai H, Yanagawa M, Kameda K, Ogura Y, Kawamura J (1996) Proc VIII Int Symp Urol pp 323-325, Dallas.
- [NANCOLLAS, 1980] Nancollas GH, Koutsoukos PG (1980) Calcium phosphate nucleation and growth in solution. *Prog Cryst Growth Charact* **3**, 77-102.
- [NISHIKAWA, 1991] Nishikawa Y, Ito H, Fuse H, Shimazaki J (1991) Silica calculi, a case report. *Hinyokika Kiyo* **37**, 625-627.
- [OTNES, 1983] Otnes B (1983) Quantitative observations on the crystalline composition of urinary stones. *Scand J Urol Nephrol* **17**, 185-190.

- [PAIS, 2006] Pais VM, Lowe G, Lallas CD, Preminger GM, Assimos DG (2006) Xanthine urolithiasis. *Urology* **67**, 1084e9-11.
- [PAK, 1981] Pak CYC (1981) Potential etiologic role of brushite in the formation of calcium (renal) stones. *J Cryst Growth* **53**, 202-208.
- [PARENT, 1999] Parent X, Boess G, Brignon P (1999) Calcium oxalate lithiasis. Relationship between biochemical risk factors and crystalline phase of the stone. *Prog Urol* **9**, 1051-1056.
- [PARKS, 1997] Parks JH, Coward M, Coe FL (1997) Correspondence between stone composition and urine supersaturation in nephrolithiasis. *Kidney Int* **51**, 894-900.
- [PARKS, 2004] Parks JH, Worcester EM, Coe FL, Evan AP, Lingeman JE (2004) Clinical implications of abundant calcium phosphate in routinely analyzed kidney stones. *Kidney Int* **66**, 777-785.
- [PEACOCK, 2002] Peacock M (2002) Primary hyperparathyroidism and the kidney: biochemical and clinical spectrum. *J Bone Miner Res* **17**, 87-94.
- [PIERAS, 2006] Pieras E, Costa-Bauzá A, Ramis M, Grases F (2006) Papillary and Nonpapillary calcium oxalate monohydrate renal calculi: comparative study of etiologic factors. *TSW Urology* **1**, 116-124.
- [PIERRATOS, 1994] Pierratos AE, Khalaff H, Cheng PT, Psihramis K, Jewett MA (1994) Clinical and biochemical differences in patients with pure calcium oxalate monohydrate and calcium oxalate dihydrate kidney stones. *J Urol* **151**, 571-574.
- [PRAS, 1994] Pras E, Arber N, Aksentijevich I, Katz G, Shapiro JM, Prosen L, Gruberg L, Harel D, Limberman U (1994) Localization of a gene causing cystinuria to chromosome 2p. *Nat Genet* **6**, 415-419.
- [PRIEN, 1947] Prien EL, Frondel C (1947) Studies in urolithiasis. I. The composition of urinary calculi. *J Urol* **57**, 949-994.
- [RIEU, 2005] Rieu P (2005) Infective lithiasis. *Ann Urol (Paris)* **39**, 16-29.
- [ROBERTSON, 1984] Robertson WC (1984) En: Metabolic bone and stone disease (Nordin BEC ed) pp 236-271, Churchill Livingstone, New York.

- [ROSE, 1975] Rose MB (1975) Renal stone formation. The inhibitory effect of urine on calcium oxalate precipitation. *Invest Urol* **12**, 428-433.
- [ROUSAUD, 1986] Rousaud A, Pedrajas A (1986) Estudio epidemiológico de la urolitiasis en España. Asociación Española de Urología. Centro de Estudios wellcome-España.
- [SAKHAEE, 2002] Sakhaee K, Adams-Huet B, Moe OW, Pak CYC (2002) Pathophysiologic basis for normouricosuric acid nephrolithiasis. *Kidney Int* **62**, 971-979.
- [SARIG, 1973] Sarig S, Raphael M, Ron A (1973) Calcium oxalate crystallization from inhibited solutions. *Isr J Chem* **11**, 635-643.
- [SARIKA, 1997] Sarika K, Turkolmez K, Kupeli B, Akpoyraz M, Durak I, Kupeli S, Kosar A (1997) Glycosaminoglycans content of Ca-oxalate stone matrix. *Urol Int* **58**, 43-46.
- [SCHNEIDER, 1982] Schneider HJ (1982) What is a urolith and what is a recurrent urolith? *J Urol* **127**, 72-74.
- [SCHNEIDER, 1985] Schneider HJ (1985) Urolithiasis: etiology. Diagnosis. En: Handbook of urology pp 137-145, Springer-Verlag, Berlin.
- [SCHULZ, 1989a] Schulz E, Börner R, Brundig P, Mäurer F (1989) Influence of different factors on the formation of calcium oxalate stones. I. Discriminant analytical computations of morphological parameters of the pelvic-calyceal systems of calcium oxalate stone formers and controls. *Eur Urol* **16**, 212-217.
- [SCHULZ, 1989b] Schulz E, Börner R, Brundig P, Mäurer F (1989) Influence of different factors on the formation of calcium oxalate stones. II. Discriminant analytical computations of morphological parameters of the pelvic-calyceal systems and clinicochemical urine parameters of controls and calcium oxalate stone formers. *Eur Urol* **16**, 218-222.
- [SCHWARTZ, 1999] Schwartz BF, Schenkman N, Armenakas NA, Stoller ML (1999) Imaging characteristics of indinavir calculi. *J Urol* **161**, 1085-1087.
- [SCOTT, 1985] Scott R (1985) Epidemiology of stone disease. *Br J Urol* **57**, 491-497.

- [SEE, 1992] See WA, Williams RD (1992) Urothelial injury and clotting cascade activation: common denominators in particulate adherence to urothelial surfaces. *J Urol* **147**, 541-548.
- [SHEKARRIZ, 2002] Shekarriz B, Stoller ML (2002) Cystinuria and other noncalcareous calculi. *Endocrinol Metab Clin North Am* **31**, 951-977.
- [SHOKEIR, 2001] Shokeir AA (2001) Renal colic: pathophysiology, diagnosis and treatment. *Eur Urol* **39**, 241-249.
- [SKRTIC, 1987] Skrtic D, Fuerdi-Milhofer H, Markovic M (1987) Precipitation of calcium oxalates from high ionic strength solutions. V. The influence of precipitation conditions and some additives on the nucleating phase. *J Cryst Growth* **80**, 113-120.
- [SÖHNEL, 1993a] Söhnel O, Grases F, March JG (1993) Experimental technique simulating oxalocalcic renal stone generation. *Urol Res* **21**, 95-99.
- [SÖHNEL, 1993b] Söhnel O, Grases F (1993) Fine structure of calcium oxalate monohydrate renal calculi. *Nephron* **63**, 176-182.
- [SPENCER, 1978] Spencer M (1978) Hydroxyapatite for chromatography. II. Sources of variability and improved methods of preparation. *J Chromatogr* **166**, 435-446.
- [STAMATELOU, 2003] Stamatelou KK, Francis ME, Jones CA, Nyberg LM, Curhan GC (2003) Time trends in reported prevalence of kidney stones in the United States: 1976-1994. *Kidney Int* **63**, 1817-1823.
- [TISELIUS, 1997] Tiselius HG (1997) Risk formulas in calcium oxalate urolithiasis. *World J Urol* **15**, 176-185.
- [TOMAZIC, 1980] Tomazic B, Nancollas GH (1980) The kinetics of dissolution of calcium oxalate hydrates. II. The dihydrate. *Invest Urol* **18**, 97-101.
- [TRAINOR, 1998] Trainor LD, Steinberg JP, Austin GW, Solomon HM (1998) Indinavir crystalluria: identification of patients at increased risk of developing nephrotoxicity. *Arch Pathol Lab Med* **122**, 256-259.
- [URIBARRI, 1998] Uribarri J, Man S, Carroll HJ (1998) The first kidney stone. *Ann Intern Med* **111**, 1006.

- [YAMAMOTO, 1990] Yamamoto N, Maeda S, Shinoda I, Takeuchi T, Fujihiro S, Kanematsu M, Kuriyama M, Ban Y, Kawada Y (1990) A case of silicate urolithiasis. *Hinyokika-Kiyo* **36**, 147-150.





# *Capítulo 2*

*Nucleación heterogénea y  
litiasis oxalocálcica*



## ***Introducción***



# INTRODUCCIÓN

## 1. Mecanismo de formación de cristales

El conocimiento de los cristales se inició a través del estudio de su composición mineralógica y de su estructura cristalográfica. Las bases científicas de la cristalografía fueron establecidas por Bravais en el siglo XIX; sin embargo, el proceso de formación del cristal fue ignorado durante un espacio mucho mayor de tiempo y, aunque los primeros conocimientos sobre el tema datan del siglo XIX (cuando científicos como Löwitz, Ostwald, Gibbs y otros realizaron trabajos pioneros), el auténtico desarrollo del conocimiento sobre esta materia no tuvo lugar hasta mediados del siglo XX.

La cristalización puede ser de distintos tipos: preparación de cristales individuales (denominados monocristales), cristalización en masa, producción de capas delgadas, biomineralización, etc. No obstante, todos ellos están gobernados por los mismos principios y procesos que son básicamente idénticos.

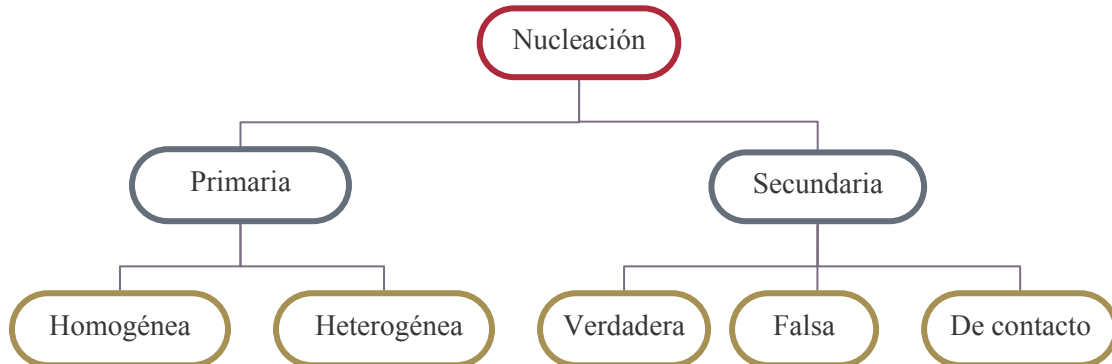
El mecanismo de formación de un cristal no se puede explicar sólo desde el punto de vista de la termodinámica, debiendo recurrir además al ámbito de la cinética. Si consideramos que, en cinética química, un choque simultáneo de tres especies en una disolución es totalmente improbable, resulta obvio que un cristal (constituido normalmente por miles de unidades) no se pueda formar mediante un choque simultáneo de tantas especies. De esta manera, la teoría actual sobre la formación de cristales admite que éstos se forman a través de dos etapas claramente diferenciadas, la nucleación y el crecimiento cristalino (con los procesos de agregación) [GRASES, 2000a].

### 1.1. Nucleación

La formación de los núcleos cristalinos es la primera (y la más importante) etapa en la formación de una masa cristalina. La nucleación implica la formación de una partícula cristalina mínima estable (clúster o germen), capaz de seguir creciendo y que con el tiempo alcanzará una dimensión macroscópica. Debe considerarse que las partículas con un tamaño inferior a cierto valor crítico son inestables y, a medida que se forman, se desintegran.

Como sólo una parte de los gérmenes llegan a una dimensión macroscópica, la velocidad del cambio de fase depende de la cantidad de gérmenes (capaces de un crecimiento posterior) que se formen por unidad de volumen del sistema en el que sucede la nucleación, y por unidades de tiempo. Esta magnitud se denomina **velocidad de nucleación**.

Los posibles mecanismos de la nucleación se pueden dividir en:



### 1.1.1. Nucleación primaria

La nucleación primaria es aquella en la cual el origen de la fase sólida nueva no se encuentra condicionada ni influida por la presencia de la fase sólida que se origina. Se trata, por ejemplo, de la nucleación de una fase sólida en una disolución totalmente libre de cualquier clase de partículas de la fase sólida o bien, que contenga sólo partículas extrañas a la fase sólida que se forma. De acuerdo con este hecho, dependiendo si las partículas extrañas a la fase sólida influyen o no, distinguimos dos mecanismos de nucleación primaria: nucleación heterogénea y homogénea respectivamente.

#### **1.1.1.1. Nucleación primaria homogénea**

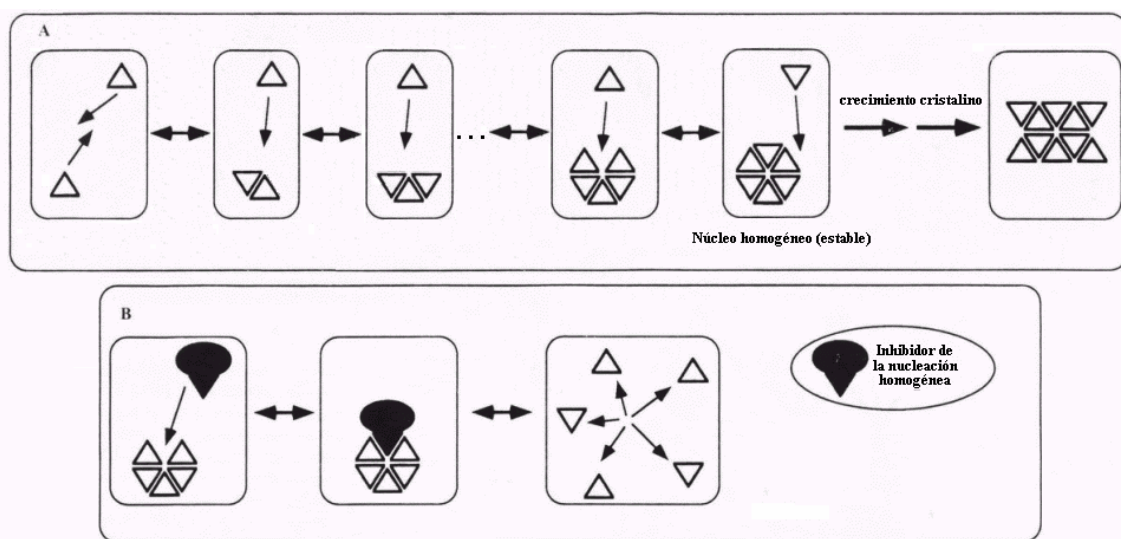
La nucleación homogénea se ha estudiado con detalle a pesar de no ser un mecanismo frecuente ni muy extendido. Es posible describirla con un modelo teórico completo, que permite la predicción del comportamiento del sistema en unas condiciones dadas y de una forma cuantitativa, pudiéndose comprobar su validez de forma experimental. El modelo de nucleación

homogénea elaborado por Farkas (1927), Becker y Döring (1935), Volmer (1939) y perfeccionado por Zeldovich (1943), no ha sufrido cambios esenciales hasta nuestros días.

Se trata de la nucleación que se da en un sistema que no contiene ninguna partícula en absoluto de la fase sólida. No se descarta que las partículas formadas de la fase sólida puedan estar presentes en el sistema cuando transcurre la nucleación, pero no tienen que facilitar o condicionar el origen de las nuevas partículas.

La formación del germen se produce por la unión de las especies (a través de reacciones bimoleculares) que constituirán los futuros cristales, en los cuales la composición del núcleo será idéntica a la composición del resto del cristal. Este tipo de nucleación es un proceso difícil y poco probable ya que requiere choques simultáneos y sucesivos de varias especies en el seno de la disolución (exige grados elevados de sobresaturación), como puede verse en la Figura 2.1.A. Como ya se ha comentado, las condiciones de sobresaturación de la orina real respecto al oxalato cálcico, incluso en individuos hipercalciúricos y/o hiperoxalúricos, hacen que la nucleación homogénea del oxalato cálcico sea prácticamente imposible [BROWN, 1991; FINLAYSON, 1978a; FINLAYSON, 1978b].

Los inhibidores de la nucleación homogénea serán aquellas sustancias capaces de unirse a las micropartículas de tamaño inferior al crítico (núcleo homogéneo), impidiendo así que alcancen el tamaño crítico y comience la formación de un cristal (Figura 2.1.B).

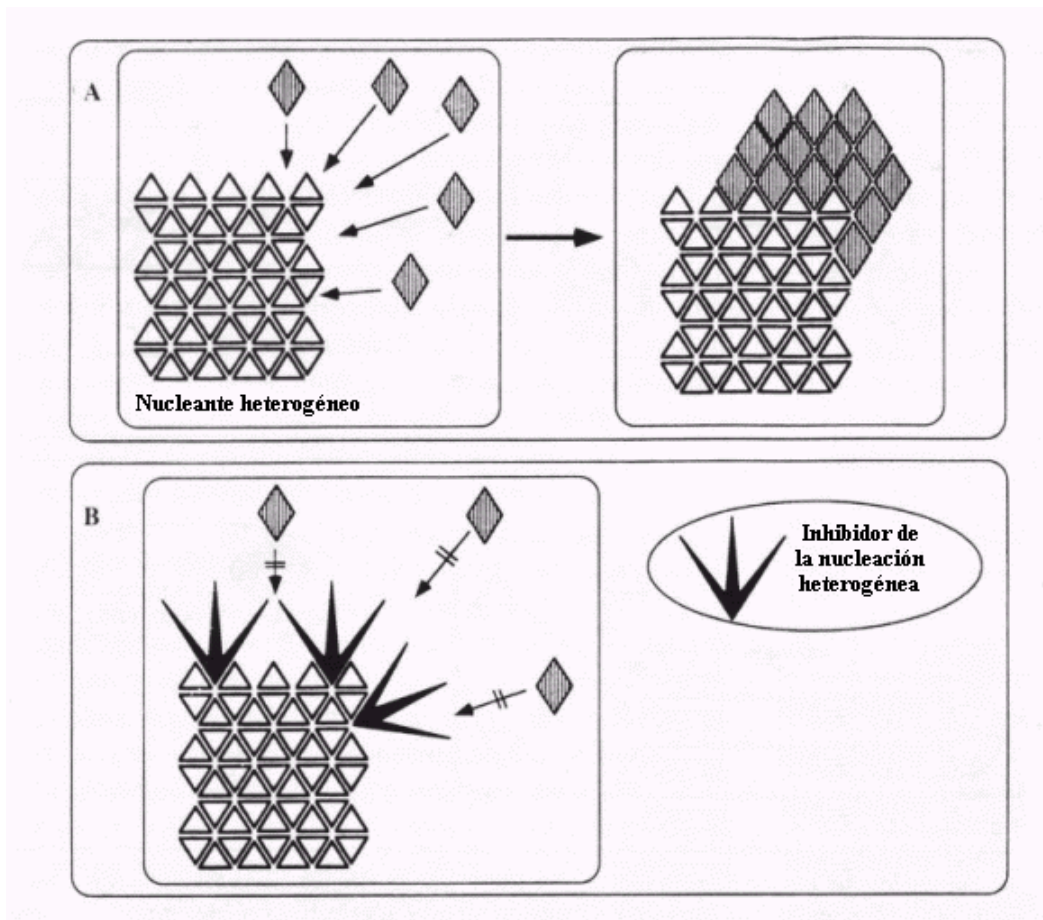


**Figura 2.1.-** Nucleación homogénea. A. Formación de un núcleo homogéneo. B. Acción de un inhibidor en la nucleación homogénea.

### 1.1.1.2. Nucleación primaria heterogénea

La nucleación heterogénea es mucho más sencilla que la homogénea; la formación de la nueva fase exige la presencia de partículas sólidas preexistentes (los llamados nucleantes heterogéneos) con capacidad de atraer y retener en su superficie las especies que constituirán el futuro cristal (Figura 2.2.A), a través de la denominada etapa de crecimiento cristalino. La superficie del nucleante heterogéneo facilita la formación de la nueva fase, por lo que actúa como catalizador de la nucleación y facilita la génesis de los gérmenes de la fase en nucleación.

Sin embargo, si el núcleo heterogéneo es una sustancia cristalina, su formación deberá haberse producido a través de un mecanismo de nucleación homogénea. En este tipo de nucleación, el núcleo presenta una composición diferente al resto del cristal. Al ser más sencilla se puede llevar a cabo con valores más bajos de sobresaturación. Los inhibidores de la nucleación heterogénea serán aquellas sustancias que eviten que los posibles núcleos heterogéneos actúen como tales, ya sea impidiendo su formación o bien dificultando la unión con las especies que constituirán el futuro nuevo cristal (Figura 2.2.B).



**Figura 2.2.-** A. Mecanismo de nucleación heterogénea. B. Acción de un inhibidor en la nucleación heterogénea.



Todos los sistemas (especialmente los líquidos) contienen partículas sólidas extrañas (polvo, partículas de las paredes del recipiente, etc.) muy difíciles y en muchos casos imposibles de eliminar del sistema. Por esta razón, en condiciones normales, si no se utilizan medidas especiales, los sistemas con sobresaturaciones menores que las correspondientes al valor crítico para la nucleación homogénea, tenderán a formar partículas de la nueva fase mediante nucleación heterogénea.

Aunque la nucleación heterogénea sea más sencilla que la homogénea y sea un mecanismo de iniciación de la nueva fase ampliamente extendido, no se ha podido resolver el tratamiento teórico de este complicado mecanismo. La teoría supone que la nucleación sobre la fase sólida se produce más fácilmente cuanto más baja sea la incongruencia entre los parámetros reticulares de las dos fases; es decir, cuanto más similares sean las dos redes. Esta incongruencia estructural se expresa como:

$$\delta = |(a-a_0)/a_0|$$

donde  $a$  y  $a_0$  son parámetros estructurales de la fase en nucleación y del nucleante heterogéneo, respectivamente. Si este índice no supera un determinado valor (normalmente centésimas), se facilitará la formación del germen sobre la fase sólida. La nucleación se dará por tanto a un nivel de sobresaturación más bajo que el que correspondería a la nucleación homogénea. Cuanto menos se diferencien las estructuras de las dos fases, más fácil será la nucleación heterogénea, y mejor catalizador de la nucleación será el sustrato (Tabla 2.1):

**Tabla 2.1.-** Sobresaturación crítica de la nucleación heterogénea de  $\text{NH}_4\text{I}$  en una disolución acuosa sobre la superficie de una fase sólida a 30 °C.

Fase sólida	$\delta$	$S_{c,het}$
Moscovita	0,0116	1,66
Zinwaldita	0,0266	1,85
Biotita	0,0340	2,17
Flogopita	0,0376	2,20

Podemos ver claramente que al aumentar la incongruencia entre la estructura de la fase en nucleación y la del nucleante heterogéneo, aumenta la sobresaturación crítica necesaria para el origen de la nueva fase sólida.

Sin embargo, la teoría de la nucleación heterogénea es difícilmente utilizable para la descripción cuantitativa de un sistema, incluso en los casos más sencillos, como por ejemplo en la formación de los gérmenes de la nueva fase en la superficie de una fase sólida estructuralmente bien definida. Las partículas extrañas a la fase sólida en formación presentes en el sistema, no solamente no se encuentran bien definidas, sino que, en la mayoría de ocasiones no se conoce su composición química, dimensiones ni origen. Muy frecuentemente se trata de partículas de polvo, coloides, etc. La capacidad nucleante de estas partículas depende a menudo de la sobresaturación de la disolución.

El número de partículas formadas de la fase nueva, para una cierta sobresaturación, se encuentra limitada por la cantidad de partículas activas extrañas a la fase sólida que se forma en el sistema. Así, la velocidad de nucleación disminuirá hasta que se agoten las partículas activas de nucleante heterogéneo.

### **1.1.2. Nucleación secundaria**

Se denomina nucleación secundaria al proceso de formación de cristales de la nueva fase que está condicionado por la presencia de partículas de la misma fase en el sistema sobresaturado y que, a causa de éstas, existe. Se trata de un mecanismo muy extendido, especialmente en la cristalización de sales muy solubles a partir de disoluciones sobresaturadas. Los conocimientos adquiridos hasta ahora de este proceso tienen un carácter empírico e incompleto. Los posibles mecanismos de nucleación secundaria se indican a continuación:

1.1.2.1. Falsa: liberación de polvo, desintegración de agregados y macroabrasión.

1.1.2.2. Verdadera: desintegración de dendritas y nucleación vegetativa.

1.1.2.3. De contacto: de contacto y por colisiones.

### 1.1.2.1. Nucleación secundaria falsa

- Liberación de polvo (*dust breeding*): se manifiesta generalmente durante la siembra de cristales (*seeds*) en una disolución sobresaturada. El número de cristales formados generalmente es mayor que el número de cristales introducidos, debido a la presencia (en la superficie de los cristales introducidos) de partículas microscópicas de la fase sólida. Estas partículas diminutas son arrastradas hacia la disolución sobresaturada desde la superficie de los cristales de mayor tamaño; cuando alcanzan un tamaño mayor que el germen crítico correspondiente a la sobresaturación existente, comienzan a crecer y pueden llegar a una dimensión observable.

- Desintegración de agregados (*polycrystalline breeding*): se produce por la inestabilidad de los agregados cristalinos que se originan durante la cristalización a elevada sobresaturación. En una etapa posterior los agregados se pueden desintegrar en cristales por (entre otras causas) la influencia de las fuerzas hidrodinámicas que actúan en una suspensión sometida a agitación, aumentando así el número de cristales presentes. Las consecuencias prácticas de este mecanismo son pocas ya que, en las condiciones en que pueden darse, existen otros mecanismos de nucleación más eficientes.

- Macroabrasión: a causa de la acción de las fuerzas mecánicas de mezcla intensa de la suspensión que cristaliza, se produce un redondeo de las esquinas y de las aristas de los cristales más grandes. Los fragmentos desprendidos en la disolución sirven como núcleos de nuevos cristales. La velocidad de nucleación mediante macroabrasión es proporcional a la concentración de fase sólida en suspensión, a la dureza de los cristales y a la calidad de la superficie cristalina.

### 1.1.2.2. Nucleación secundaria verdadera

En la nucleación secundaria verdadera los gérmenes de los cristales nuevos se pueden originar en la superficie del cristal en crecimiento, en la capa límite del líquido contiguo al cristal o en el volumen de la disolución sobresaturada que se encuentra en las proximidades del cristal.

- Desintegración de dendritas: cuando los cristales crecen en un medio con una sobresaturación alta, su superficie no se desarrolla uniformemente y se pueden originar dendritas. Debido a la acción de las fuerzas hidrodinámicas o de la recrystalización espontánea,

las dendritas se separan de los cristales y pasan al volumen del sistema sobresaturado, en donde actúan como centros de cristalización (*dendrite breeding*).

- Nucleación vegetativa (*vegetative nucleation*): supone la formación, en la capa límite del líquido contiguo al cristal, de agrupaciones de moléculas de la fase que cristaliza con una estructura considerablemente ordenada. Estas agrupaciones se pueden dispersar en la disolución a causa de las fuerzas hidrodinámicas que actúan en el sistema que se mezcla, y luego sirven como gérmenes para el origen del resto de cristales.

#### 1.1.2.3. Nucleación secundaria de contacto

En la nucleación secundaria de contacto, las partículas microscópicas de la fase en formación se generan por la acción de una fuerza mecánica sobre los cristales que hay en la disolución sobresaturada. Según el origen de esta fuerza mecánica hablamos de:

- Nucleación de contacto: por el contacto de un objeto sólido con la superficie del cristal.

- Nucleación por colisión: por choques mutuos entre cristales, entre los cristales y el mezclador, o con la pared del recipiente en una suspensión agitada.

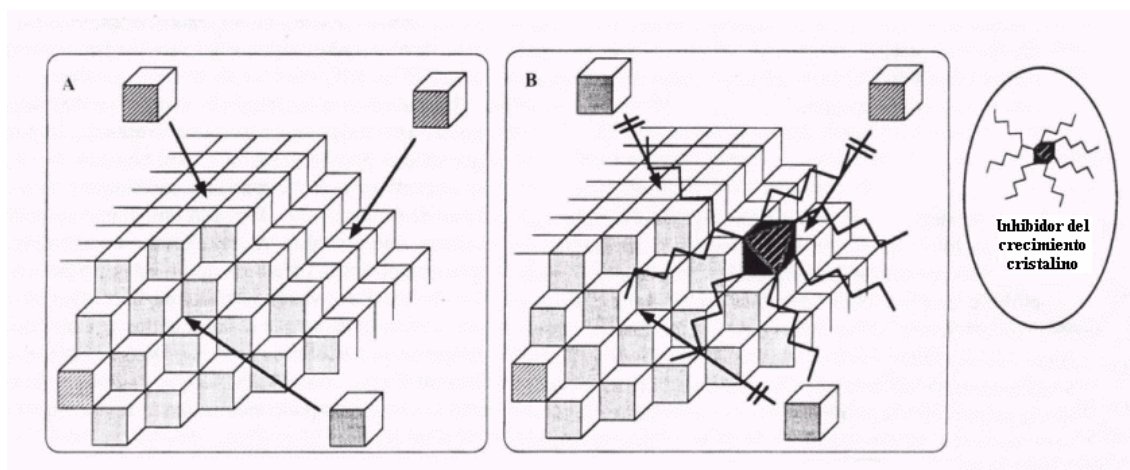
Las partículas liberadas frecuentemente tienen una dimensión igual o mayor a la del núcleo crítico, por lo que cuando llegan a la disolución sobresaturada circundante inician su crecimiento. La nucleación secundaria de contacto es un mecanismo muy eficaz para el origen de nuevas partículas y, en la mayoría de los casos predomina sobre el resto de mecanismos de nucleación secundaria.

No se debe confundir la macroabrasión con la nucleación secundaria de contacto, ya que mientras que en la primera se desprenden fragmentos de cristales, en la segunda se liberan gérmenes cristalinos, de dimensiones mucho menores que los fragmentos.

Una vez se ha constituido el núcleo, sea homogéneo o heterogéneo, el desarrollo posterior de cualquier masa cristalina implica la combinación de la llamada etapa de crecimiento cristalino con los procesos de agregación (primaria y/o secundaria).

## 1.2. Crecimiento cristalino

El crecimiento cristalino supone la incorporación gradual de las unidades que constituirán el futuro cristal sobre las caras del mismo, en zonas especialmente favorecidas: escalones, terrazas,... (Figura 2.3.A).



**Figura 2.3.-** A. Cristal en crecimiento. B. Acción de un inhibidor en la etapa del crecimiento cristalino.

En disoluciones sobresaturadas este proceso de crecimiento es muy favorable y se da con mayor facilidad. Los inhibidores del crecimiento cristalino son sustancias que se adsorben sobre las superficies del cristal ya formado, impidiendo o dificultando la incorporación de nuevas unidades cristalinas al mismo, y en consecuencia, impidiendo o dificultando el proceso de crecimiento (Figura 2.3.B).

El proceso de crecimiento cristalino tiene lugar como resultado de la interacción entre dos fases: disolución y sólida. En la interfase hay un cambio brusco de las propiedades del medio, lo que provoca que su estudio sea difícil. En el crecimiento de los cristales concurren tres procesos cinéticos, que son:

1. Transporte de materia (de unidades constructivas) desde el volumen de la disolución sobresaturada hacia el cristal por difusión y/o convección.
2. Incorporación de dichas unidades al cristal, proceso denominado reacción superficial.
3. Evacuación del calor de cristalización desde el cristal hasta el seno de la disolución.

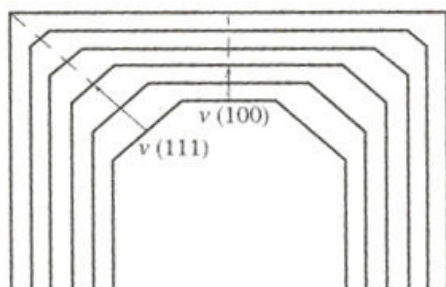
La diferencia de concentración entre el seno de la disolución y la superficie del cristal representa la fuerza motriz del transporte de materia. La diferencia entre la concentración en la superficie del cristal y la concentración de equilibrio representa la fuerza motriz de la reacción superficial. Desde el punto de vista cinético, el transporte de materia y la reacción superficial son reacciones consecutivas. Por este motivo, la velocidad global de crecimiento vendrá determinada por el proceso que tenga una velocidad menor; es decir, por el más lento de los dos:

- ★ Crecimiento dirigido por procesos de transporte: se da cuando el transporte de materia hacia el cristal es más lento que la reacción superficial; es decir, la cantidad de materia que llega al cristal por transporte desde la disolución es menor que la materia que se podría incorporar al cristal; así, la concentración en la superficie del cristal baja casi hasta la concentración en equilibrio (saturación).
- ★ Crecimiento dirigido por reacción superficial: es la situación contraria a la anterior, cuando el transporte de materia es más rápido que la reacción superficial. La concentración en la superficie del cristal es prácticamente igual que en la disolución.
- ★ Si la velocidad de las dos acciones son comparables, es necesario considerar el proceso de transporte y la reacción superficial simultáneamente, ya que los dos procesos se combinan en el crecimiento.

La incorporación de la unidad constructiva a la red cristalina se puede dividir en diferentes procesos consecutivos. Primero, la unidad constructiva llega a la capa de adsorción en la superficie del cristal desde la disolución. Esta acción viene acompañada por una deshidratación parcial de la unidad constructiva. Las unidades constructivas se mueven en la capa de adsorción sobre la superficie del cristal hasta que llegan a un lugar desde donde se pueden incorporar al cristal o hasta que vuelven de nuevo a la disolución. Si se incorporan al

crystal, al mismo tiempo sufren una desolvatación completa; únicamente después se forman enlaces fuertes, con los que definitivamente se llega a la incorporación total de la unidad constructiva a la red cristalina.

Una misma sustancia puede adquirir hábitos de cristalización diferentes dependiendo de las condiciones de su formación. Durante el crecimiento del cristal, las caras se desplazan en dirección a la perpendicular que va desde el centro del cristal hacia la superficie. La velocidad de crecimiento de la cara depende especialmente de la sobresaturación de la fase vecina con la que está en contacto. Las caras de un cristal con la misma dirección cristalográfica crecen a igual velocidad, mientras que las de dirección diferente pueden crecer a otra velocidad. El cristal se encuentra limitado generalmente por las caras que crecen más lentamente (las de mayor densidad reticular), debido a que las que crecen rápidamente desaparecen durante el crecimiento, como podemos ver en la Figura 2.4:



**Figura 2.4.-** Desaparición de las caras (111) que crecen rápidamente.

La velocidad de crecimiento del cristal se puede expresar cuantitativamente como la velocidad de desplazamiento de una cara dada en dirección perpendicular a la misma (*velocidad lineal de crecimiento*) con relación a un punto fijo en el cristal, o también como la velocidad total, que no se encuentra relacionada con ninguna superficie del cristal en concreto.

### **1.2.1. Condiciones energéticas durante el crecimiento de los cristales**

La estructura de la superficie del cristal para distintas caras del mismo es diferente. Su estructura es bastante complicada, pero se considera que el cristal está formado por pequeños cubos con una longitud de arista igual al parámetro de red. Se considera que el cristal tiene una temperatura cercana al cero absoluto, de esta manera la estructura de la superficie no se encuentra alterada como consecuencia de las fluctuaciones térmicas. Así, las unidades de crecimiento ocupan posiciones regulares en la celda cristalina.

El orden en que las unidades constructivas se introducen en el cristal viene determinado por las energías de enlace en cada una de las posiciones, que se ocuparán siguiendo un orden de energía decreciente. Se ocupan primero los defectos de la superficie y los defectos de posibles escalones que se pueden encontrar. Después las unidades se unirán a las fracturas de los escalones. Posteriormente, se van formando nuevas capas en la superficie del cristal.

### **1.2.2. Dislocaciones en los cristales**

La presencia de dislocaciones en los cristales fue postulada por Burgers en el año 1939. Las dislocaciones pueden clasificarse en helicoidales, de eje o mixtas. Las más importantes en el crecimiento cristalino son las helicoidales. La densidad de dislocaciones en un cristal se determina por el número de las llamadas líneas de dislocación que hay por unidad de área de la superficie o dentro del cristal. En cristales perfectos, la densidad de dislocaciones se encuentra entre  $10^2$  y  $10^3 \text{ cm}^{-2}$ ; en cristales muy deformados entre  $10^{11}$  y  $10^{13} \text{ cm}^{-2}$ .

En los cristales las dislocaciones pueden originarse a causa de diferentes factores. Los más importantes son:

- ★ La presencia de impurezas incorporadas al cristal durante su crecimiento, y sobre todo, la desigualdad de su distribución que origina tensión en la red, la cual se libera con el desplazamiento de parte del cristal (dislocación helicoidal).
- ★ Por la acción de fuerzas externas sobre el cristal, que pueden ser debidas a las corrientes de concentración en la disolución, al choque mecánico del mezclador, a la colisión de dos cristales, etc. (dislocación helicoidal).
- ★ Durante la incorporación parcial de una partícula sólida extraña al cristal, se originan en la frontera de contacto cristal-partícula dislocaciones helicoidales.
- ★ En el contacto de diferentes partes del cristal con ordenaciones cristalográficas distintas, se puede originar una dislocación.

Frecuentemente nos encontramos con que la dislocación no se forma solamente por uno de los mecanismos explicados, sino que en su origen participan al mismo tiempo más de uno a la vez.

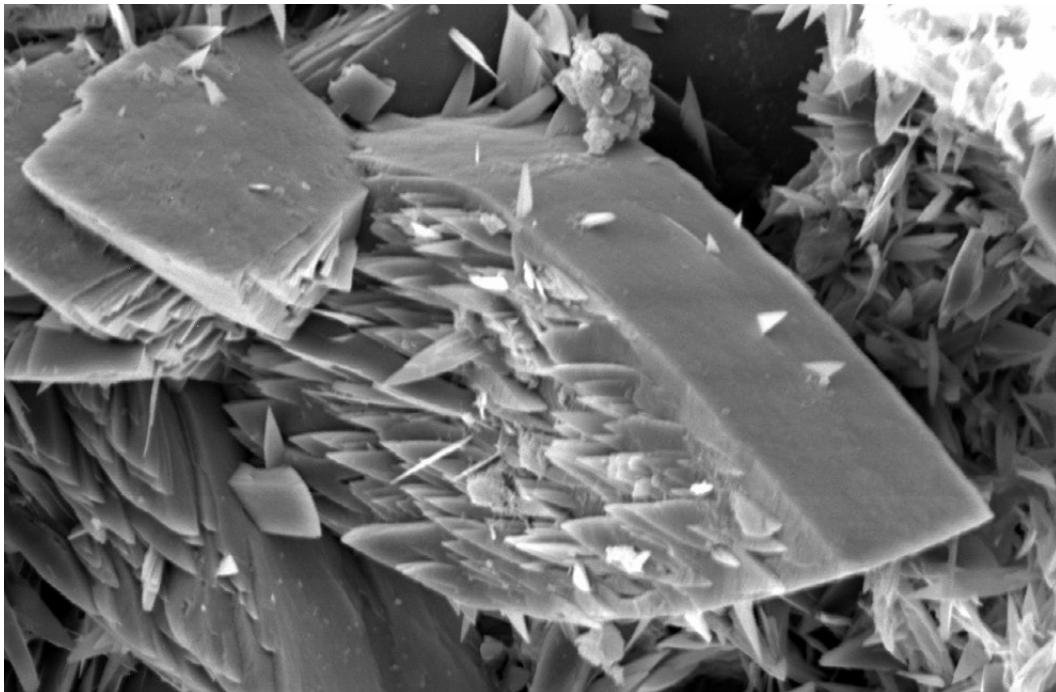


### 1.3. Agregación

Durante la cristalización en masa o colectiva se forman principalmente agregados (primarios y secundarios) en lugar de cristales individuales. Así, podemos distinguir:

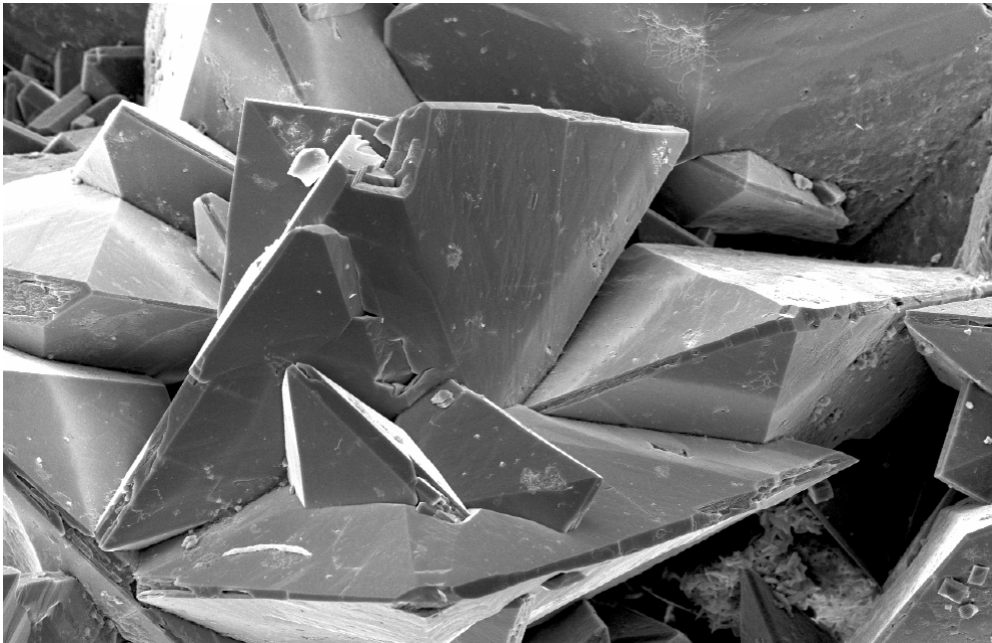
#### 1.3.1. Agregación primaria

La agregación primaria implica la formación de nuevos cristales (cristales *hijos*) impulsada por los ya constituidos (cristales *padres*), que actúan favoreciendo su crecimiento sobre sus propias caras (Figura 2.5). Durante el proceso de su formación los gérmenes nuclean en las imperfecciones de las superficies cristalinas de los cristales *padres* o cerca de sus aristas, pudiendo llegar a un tamaño similar al del cristal *padre* [JONES, 1989]. Se forman así los aglomerados formados por cristales sin ninguna orientación predominante sobre las caras de los otros (Figura 2.6) y también los cristales gemelos colocados simétricamente.



**Figura 2.5.-** Formación de un agregado primario de oxalato cálcico monohidrato.

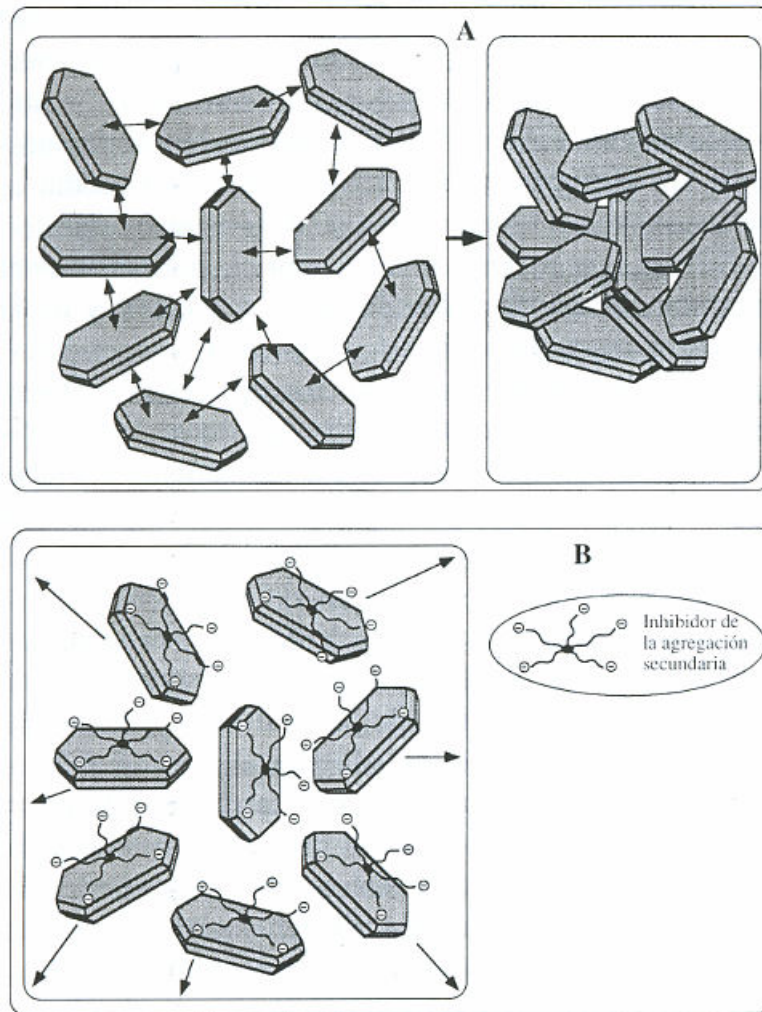
Este tipo de agregación no se da con la misma facilidad en los distintos tipos de cristales, de modo que depende de la naturaleza del mismo, siendo por ejemplo, muy favorable en el caso de los cristales de oxalato cálcico [GRASES, 1992a; GRASES, 1992b; MILLÁN, 1992]. Así, la agregación primaria juega un papel muy importante en el desarrollo de cálculos renales [SÖHNEL, 1993]. Existen muy pocos datos sobre los inhibidores de la agregación primaria; sin embargo, al ser este proceso fundamentalmente un caso particular del crecimiento cristalino, presumiblemente los inhibidores del crecimiento cristalino también actuarán como inhibidores de la agregación primaria.



**Figura 2.6.-** Formación de un agregado primario de oxalato cálcico dihidrato.

### **1.3.2. Agregación secundaria**

La agregación secundaria (también llamada von Smoluchowski) consiste en la unión de cristales ya formados entre sí, como resultado de enlaces débiles que se establecen entre ellos. En ocasiones, dichas uniones se encuentran favorecidas por la presencia de sustancias que actúan como puente de unión entre cristal y cristal (Figura 2.7.A). Mediante este tipo de agregación se forman aglomerados débilmente unidos, frecuentemente casi desconectados, dispuestos en estructuras desordenadas.



**Figura 2.7.-** A. Agregación secundaria. B. Acción de los inhibidores de la agregación secundaria.

Para que los efectos de este proceso puedan llegar a ser importantes es imprescindible que en el medio haya una cantidad elevada de cristales. Así, en la litiasis oxalocálcica, donde la cristaluria es escasa o incluso inexistente, la contribución de la agregación secundaria en la formación del cálculo es despreciable [GRASES, 1993a; MILLÁN, 1992]; mientras que, en la litiasis infecciosa y de fosfatos cálcicos (donde habitualmente hay una presencia muy notable de cristales) los procesos de agregación secundaria pueden ser importantes. Los inhibidores de la agregación secundaria son sustancias que se adsorben sobre las superficies de los cristales, dotándoles de carga eléctrica del mismo signo, lo que genera repulsiones entre ellos, impidiendo o dificultando su posterior acercamiento para formar el agregado secundario (Figura 2.7.B).

## 2. Período de inducción de la cristalización

Ya desde el comienzo del siglo XX, se observó que entre el establecimiento de la sobresaturación y el origen observable de la nueva fase transcurría un tiempo determinado que dependía sobre todo de la magnitud de la sobresaturación y de la temperatura del sistema. Este tiempo, durante el cual la disolución homogénea sobresaturada pasa a ser un sistema heterogéneo se conoce como periodo de inducción (*induction time*), tiempo de espera (*waiting time*) o periodo de incubación (*incubation period*).

Podemos determinar este periodo de diferentes maneras: observando la turbidez de la disolución, el descenso de la concentración o de la conductividad de la disolución, etc. Los periodos de inducción de la cristalización de un mismo sistema, establecidos por diferentes métodos, en condiciones idénticas no tienen porqué ser iguales. Pueden oscilar entre milisegundos y años, según el tipo de sistema y las condiciones existentes (principalmente sobresaturación y temperatura).

El periodo de inducción de la cristalización puede dividirse en tres intervalos de tiempo: tiempo necesario para el establecimiento de una distribución estacionaria del tamaño de los gérmenes en la disolución sobresaturada ( $t_i$ ); tiempo necesario para el origen del germen crítico ( $t_n$ ) y el tiempo necesario para que el germen crítico crezca hasta un tamaño detectable ( $t_g$ ), que depende del sistema usado para seguir el proceso de nucleación. Así, nos queda:

$$t_{\text{ind}} = t_i + t_n + t_g$$

Esta ecuación supone la descomposición del periodo de inducción en acciones separadas sucesivas. Sin embargo, el origen de una nueva fase en una disolución sucede de forma gradual y continua, nunca a saltos, como podría deducirse de la ecuación anterior. El tiempo  $t_i$  es despreciable en la mayoría de cristalizaciones en disolución; por tanto podemos considerar  $t_i \approx 0$ . De esta manera la ecuación nos queda:  $t_{\text{ind}} = t_n + t_g$ , por lo que pueden darse las tres situaciones siguientes:

1.  $t_n \ll t_g$ ; nos quedaría que  $t_{\text{ind}} \approx t_g$ ; este hecho significa que el periodo de inducción está determinado fundamentalmente por el crecimiento de los gérmenes; es decir, por el tiempo necesario para que los gérmenes de los cristales presentes en la disolución crezcan hasta tener una dimensión detectable.

2.  $t_n \gg t_g$ ; nos quedaría que  $t_{ind} \approx t_n$ ; implica que el periodo de inducción está determinado por el origen de los gérmenes críticos. De esta manera el germen crece rápidamente después de su origen hasta llegar a un tamaño detectable (sólo puede producirse cuando la estructura de la superficie del germen corresponde a la estructura de la fase que se forma).

En muchas ocasiones, las dos estructuras no son idénticas, y por esta razón el germen crítico formado no crece rápidamente desde el comienzo. El crecimiento rápido se alcanza después del cambio en la estructura del germen, que sucede como consecuencia del ordenamiento estructural repentino de todo el germen o de la unión progresiva de las unidades constructivas a la superficie, con lo cual se forma gradualmente la estructura cristalina requerida.

3.  $t_n \approx t_g$ ; en este caso no podemos simplificar y nos quedaría  $t_{ind} = t_n + t_g$ ; este hecho significa que el periodo de inducción incluye tanto la formación como el crecimiento de los gérmenes. Este caso requiere un tratamiento matemático especial.

### 3. Inhibidores de la cristalización

Se han observado casos en que individuos con parámetros urinarios casi idénticos, unos generan cálculos y otros no. La explicación de este fenómeno puede efectuarse en parte admitiendo la presencia en la orina de sustancias (inhibidores) que dificultan o impiden el crecimiento y la agregación de determinadas sustancias sólidas. Su mecanismo de acción consiste en la unión (enlace) de los inhibidores a la superficie del cristal inhibiendo el posterior crecimiento así como ejerciendo una inducción epitaxial del crecimiento.

La inhibición es más efectiva cuanto mayor es la fuerza de adsorción a los centros activos de crecimiento del cristal y mayor la distorsión provocada en la red cristalina, dificultando así la incorporación de nuevas unidades constructivas al cristal.

Las sustancias con propiedades inhibidoras pueden presentar simultáneamente propiedades complejantes respecto a alguna de las especies implicadas en el proceso de precipitación. De esta manera, disminuye la concentración efectiva en el medio de una especie precipitante, por lo que también disminuirá el grado de sobresaturación y, en consecuencia, la



facilidad de precipitación. Así, uno de los factores más importantes en el desarrollo de la cristalización patológica es la ausencia de inhibidores.

A finales del siglo XIX se empezó a intuir la existencia en la orina de sustancias que podían actuar sobre la cristalización del oxalato cálcico, carbonato cálcico y ácido úrico, y que en consecuencia se podrían relacionar con la formación de sus respectivos cálculos, como lo demuestra el libro publicado por Ord en 1879. Sin embargo, no fue hasta la década de los 60 cuando se comenzó a conocer, valorar y entender el comportamiento de aquellas sustancias que eran capaces de impedir o dificultar la cristalización de compuestos insolubles y que actualmente conocemos como inhibidores de la cristalización.

Así, en 1965 los trabajos de Bliznakov pusieron de manifiesto que determinadas moléculas tenían la capacidad de disminuir la velocidad de crecimiento cristalino de ciertas sustancias como consecuencia de su adsorción (unión) sobre la superficie en crecimiento y la correspondiente alteración que provocaba *[BLIZNAKOV, 1965]*. Durante la misma época, también se demuestra que una serie de sustancias contenidas en la orina, entre ellas el pirofosfato (fue el primer inhibidor biológico reconocido), eran capaces de impedir procesos de calcificación *[FLEISCH, 1962; FLEISCH, 1964; HOWARD, 1958; HOWARD, 1967; VERMEULEN, 1958]*.

Estos hallazgos provocaron que durante la década siguiente se efectuase una gran cantidad de estudios en donde se describían muchas sustancias con supuestas propiedades inhibitoras *[ROBERTSON, 1985]*, la mayoría de ellas contenidas de forma natural en la orina (pirofosfato, magnesio, glicosaminoglicanos (GAGS), glicoproteína Tamm-Horsfall (TH), citrato, aminoácidos, ácido ribonucleico,...) aunque otras eran de origen sintético (azul de metileno, glicanos sintéticos, fosfocitrato,...). No obstante, no se estableció ninguna aplicación práctica de estos estudios hasta los años 80 cuando se comenzaron a utilizar inhibidores de la cristalización (el citrato) en el tratamiento médico de la urolitiasis *[BARCELÓ, 1993; NICAR, 1986; PAK, 1985; PAK, 1987; PAK, 1991; PREMINGER, 1985a]*.

Se han estudiado y se continúan estudiando las propiedades inhibitoras de una serie de sustancias (magnesio, pirofosfato, macromoléculas, citrato, fitato) en la litiasis oxalocálcica y fosfática. En una primera etapa, parecía que los inhibidores más efectivos de la cristalización del oxalato cálcico eran las macromoléculas polianiónicas como el ARN, los GAGS y la glicoproteína TH, mientras que para el fosfato cálcico eran más efectivos los iones más pequeños como el magnesio, el citrato y el pirofosfato *[MEYER, 1985]*. Hoy en día, numerosos estudios *[GRASES, 1989a; GRASES, 1991a; GRASES, 1994a; GRASES, 2000b]* confirman la superioridad

del fitato como el inhibidor más potente de las sales cálcicas (tanto del oxalato como de los fosfatos).

### 3.1. El Magnesio

El efecto del magnesio sobre la precipitación del oxalato cálcico ha sido objeto de cuantiosos estudios con resultados contradictorios. Según unos autores actúa como inhibidor de la cristalización del oxalato cálcico [DESMARS, 1973; GRASES, 1989b; HALLSON, 1982; LI, 1985; MIYAKE, 1998], mientras que otros [GRASES, 1991a; MEYER, 1975; SUTOR, 1969; WELSHMAN, 1972] afirman que tiene poco o ningún efecto. Un tercer grupo de autores [FELIX, 1977; ROBERTSON, 1973; RYALL, 1981a] coinciden en que se comporta como un inhibidor sólo a concentraciones elevadas, muy superiores a las encontradas normalmente en orina.

### 3.2. El pirofosfato

La molécula de pirofosfato (Figura 2.8), formada por dos moléculas de fosfato unidas mediante un enlace éster, es un componente natural de las células de los mamíferos [TERKELTAUB, 2001].

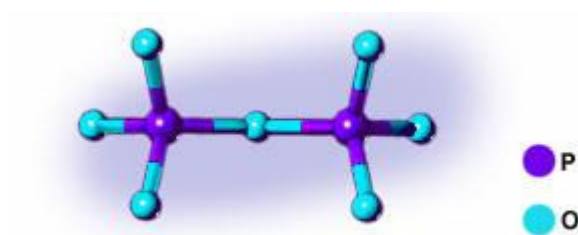


Figura 2.8.- Molécula de pirofosfato.

El pirofosfato fue el primer inhibidor identificado en la orina [FLEISCH, 1962] al que se le asignó un papel de potente inhibidor de la cristalización del fosfato cálcico [FLEISCH, 1962; FLEISCH, 1966] y del oxalato cálcico [FLEISCH, 1964]. Sin embargo, estudios posteriores dieron

lugar a resultados contradictorios. Mientras que algunos autores [*FELLSTRÖM, 1985a; MEYER, 1974*] observaron que el pirofosfato era el inhibidor más efectivo en la precipitación del oxalato y los fosfatos cálcicos, y de la acción de los fosfatos cálcicos como nucleantes heterogéneos [*GRASES, 1989c*], otros [*BISAZ, 1978; SARIG, 1973*] vieron que tenía poco efecto. Según muchos autores, no existen pruebas claras de su deficiencia en los enfermos litíasicos e incluso, con el uso del “jarabe de fosfatos” puede observarse un incremento en la excreción de pirofosfato en individuos sanos pero no en los litíasicos [*CONTE, 1989a*]; no obstante también se encuentran estudios que demuestran su menor presencia en orina de pacientes litíasicos [*BAUMANN, 1985; LAMINSKI, 1990; SHARMA, 1992*]. Por otra parte, el pirofosfato parece ser que no influye en la precipitación de otros constituyentes de cálculos, como son el fosfato amónico magnésico o el ácido úrico [*FLEISCH, 1967*].

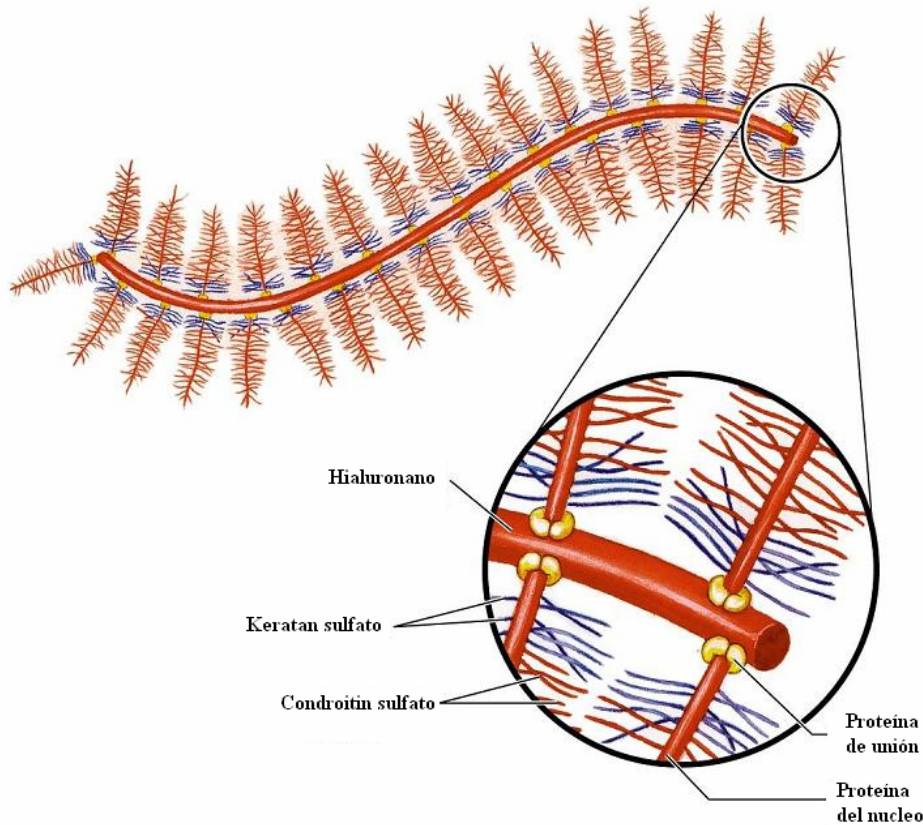
Estudios más recientes demuestran que es el inhibidor natural más efectivo de la nucleación de hidroxiapatita a bajas concentraciones ( $2.87 \times 10^{-6}$  M) [*GRASES, 2000b*], reduciendo también la nucleación de oxalato cálcico [*SASO, 1998*] aunque en algunos casos el efecto es mínimo [*GRASES, 1991a*]. Además presenta un efecto sinérgico con el fitato en la inhibición de la nucleación de brushita y con el citrato en la inhibición de la nucleación de hidroxiapatita [*COSTA-BAUZÁ, 2002*]. De esta manera una excreción baja de pirofosfato sería un claro factor de riesgo en la litiasis renal.

### 3.3. Las moléculas polianiónicas

#### 3.3.1. Los GAGS

Los glucosaminoglucanos (GAGS) son cadenas de polisacáridos constituidas por la repetición de unidades idénticas de disacáridos. Aunque pueden encontrarse libres, normalmente se encuentran unidos covalentemente a una proteína formando los proteoglucanos. Los proteoglucanos pueden formar agregados (Figura 2.9) en los cuales las moléculas de proteoglucano están unidas por enlaces no covalentes a un largo filamento de hialuronano (anteriormente denominado ácido hialurónico). Los proteoglucanos presentan un componente glicídico superior al 90 %, a diferencia de las glicoproteínas donde dicho componente oscila entre un 5-70 %. Los GAGS son componentes fundamentales de la membrana basal glomerular y del mesangio.





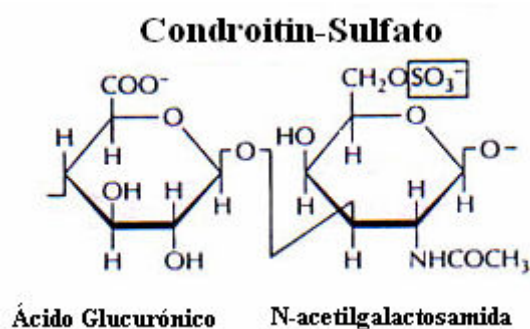
**Figura 2.9.-** Estructura de los proteoglucanos.

Desde que se demostró que los GAGS tienen influencia sobre el crecimiento cristalino y la agregación del oxalato cálcico [CRAWFORD, 1968; ROBERTSON, 1973] y que son componentes normales en la orina [GOLDBERG, 1972; WESSLER, 1971], se han publicado muchos trabajos en los que generalmente se demuestra cierta capacidad inhibidora del crecimiento de los cristales de oxalato cálcico [ANGELL, 1989; FELLSTRÖM, 1985a; FELLSTRÖM, 1985b; MARTIN, 1984; NORMAN, 1984; ROBERTSON, 1985; SUZUKI, 1996; TISELIUS, 1985], aunque en ningún caso esta acción es relevante respecto a la calculogénesis oxalocálcica [GRASES, 1989b; GRASES, 1989d].

Respecto a sus efectos sobre la agregación del oxalato cálcico, la situación no es tan clara, y al igual que se han descrito efectos inhibidores, también se han postulado efectos promotores [ROBERTSON, 1985; SUZUKI, 1996]. Sin embargo, se ha demostrado que los procesos de agregación secundaria son irrelevantes en la calculogénesis oxalocálcica [GRASES, 1992a; GRASES, 1992b; SÖHNEL, 1993] y que los agregados cristalinos observados se forman fundamentalmente a través de agregación primaria. Desgraciadamente los GAGS no ejercen un efecto demasiado significativo sobre este proceso de agregación primaria [GRASES, 1990; GRASES, 1994a].

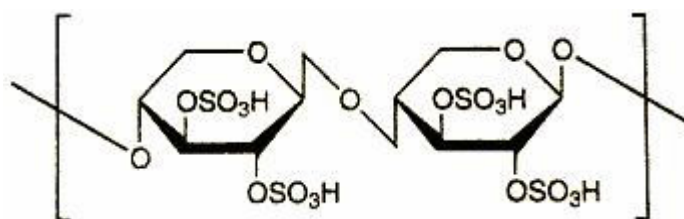
Como ya se ha comentado, la nucleación de cristales de oxalato cálcico en orina humana (incluso en presencia de hipercalcemia o hiperoxaluria) transcurre a través de procesos de nucleación heterogénea [FINLAYSON, 1978a], siendo una etapa crucial en la formación del cálculo [GRASES, 1993a]. De los estudios realizados [GRASES, 1991a; GRASES, 1994a; OSSWALD, 1988] puede deducirse que los GAGS estabilizan las disoluciones metaestables de oxalato cálcico y evitan así su nucleación heterogénea. También se ha demostrado que estabilizan las disoluciones de ácido úrico, impidiendo su nucleación homogénea [GRASES, 1991b]. Si consideramos que el ácido úrico es un nucleante heterogéneo activo del oxalato cálcico [GRASES, 1991b; MANDEL, 1981], al evitar la formación de sus cristales, se imposibilita que éstos actúen como nucleantes heterogéneos del oxalato cálcico (evita el inicio de la litiasis oxalocálcica).

El condroitín sulfato es un GAG natural formado por el ácido glucurónico y la N-acetilgalactosamina, (Figura 2.10).



**Figura 2.10.-** Estructura del condroitín sulfato.

El pentosán polisulfato es una molécula polianiónica sintética de estructura similar a la heparina (Figura 2.11). Es un buen inhibidor de la nucleación del oxalato cálcico [GRASES, 1991a].



**Figura 2.11.-** Estructura del pentosán polisulfato.

Tanto uno como el otro inhiben el crecimiento cristalino del oxalato cálcico [KOK, 1988; MARTIN, 1984; SENTHIL, 1996; SHUM, 1993]; además, el condroitín sulfato presenta una gran actividad inhibidora cuando el ácido úrico actúa como nucleante heterogéneo [GRASES, 1989c].

Respecto a la excreción de los GAGS, unos grupos de investigadores no han encontrado diferencias entre los litiásicos oxalocálcicos e individuos sanos [AKINCI, 1991; CAUDARELLA, 1983; HARANGI, 1996; RYALL, 1983; SALLIS, 1979], otros detectan excreciones inferiores en el grupo de enfermos [ERTURK, 2002; GRASES, 1994b; OMBRA, 2003; PÉREZ, 2001; ROBERTSON, 1978; SIDHU, 1989] y otros encuentran incluso cantidades superiores en este grupo [TRINCHIERI, 1991]. Esta diferencia en los resultados es debida a que los estudios no se han efectuado en las mismas condiciones (la excreción de los GAGS depende de la edad, sexo, dieta y estación del año [CAUDARELLA, 1988; DANES, 1967; HESSE, 1986; HESSE, 1991; MARTELLI, 1985; TRINCHIERI, 1991] ni se ha utilizado el mismo método analítico [GRASES, 1994b].

### 3.3.2. Las glicoproteínas

Las glicoproteínas son proteínas que llevan cadenas de carbohidratos (oligosacáridos) unidas covalentemente mediante enlaces glicosídicos (Figura 2.12). La más conocida y abundante en la orina es la Tamm-Horsfall. La mucina también es una de ellas.

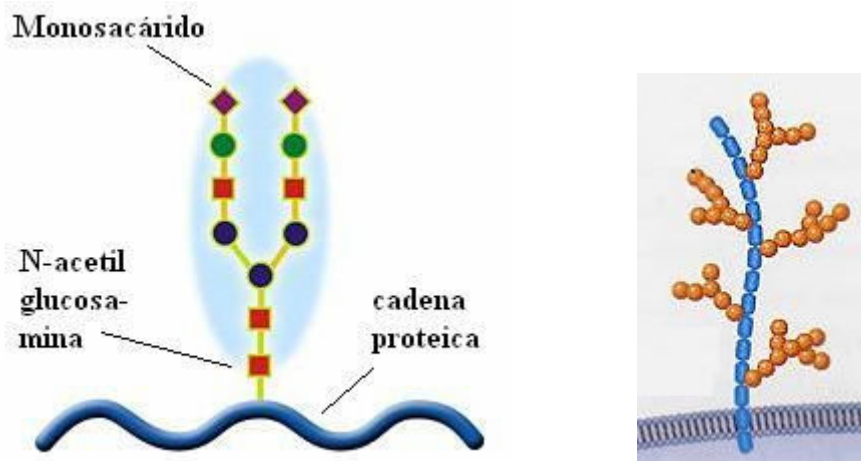


Figura 2.12.- Estructura de las glicoproteínas.

Análogamente a los GAGS [FELLSTRÖM, 1985a], diferentes estudios demuestran que las glicoproteínas (Tamm-Horsfall, nefrocalcina, osteopontina, bikunina) tienen cierta capacidad inhibidora de la cristalización del oxalato cálcico [DOYLE, 1991; GROVER, 1990; HESS, 1989; HESS, 1991; HESS, 1992; HOYER, 1995; NAKAGAWA, 1981; NAKAGAWA, 1984; RYALL, 1995], aunque en ningún caso parece decisiva [EDYVANE, 1987; LANZALACO, 1988; ROBERTSON, 1985; WORCESTER, 1987].

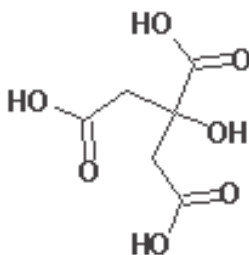
En esta última década, se las ha considerado como las principales defensas naturales contra la nefrocalcinosis. Sin embargo, existen diferentes opiniones sobre si actúan como promotores o como inhibidores del crecimiento y de la agregación en la cristalización del oxalato cálcico [SALLIS, 1985; XIE, 2001]. De hecho, los experimentos *in vitro* y los datos clínicos más recientes parecen demostrar la capacidad inhibidora de estas sustancias macromoleculares [ASPLIN, 1998; GROVER, 1998; MEDETOGNON-BENISSAN, 1999; MO, 2004; ROMERO, 1997; RYALL, 2005; SCHEPERS, 2002; TSUJIHATA, 2001; WESSON, 1998]. Aun así, otros autores les asignan propiedades promotoras [CARVALHO, 2002; GOVINDARAJ, 2001; KHAN, 2000; KONYA, 2003; LIESKE, 2001; YAMATE, 1996].

Macroagregados de estas glicoproteínas pueden actuar también como nucleantes heterogéneos del oxalato cálcico, facilitando la formación de agregados cristalinos al posibilitar que se originen al mismo tiempo varios cristales sobre la misma superficie [DRACH, 1980; GRASES, 1990], y por tanto en este aspecto, manifestarían una acción promotora de la calculogénesis. Por otra parte, la mucina inhibe la cristalización del ácido úrico a concentraciones encontradas normalmente en orina [GRASES, 1999a]. Hay estudios en que se observa una concentración de osteopontina menor en los pacientes litíasicos respecto a individuos sanos [YASUI, 1999], mientras que otros no observan diferencias entre ellos [KLEINMAN, 2004]. Este comportamiento aparentemente antagónico de las glicoproteínas es objeto de estudio en esta tesis.

Aunque tanto para los GAGS como para las glicoproteínas se ha descrito cierta capacidad inhibidora, no debemos olvidar su función como sustancias antiadherentes en la prevención de partículas sólidas adheridas sobre el uroepitelio [EBISUNO, 1999; GRASES, 1993b; GRASES, 1996a; KUMAR, 2003; KUMAR, 2005; SEE, 1992; TSUJIHATA, 2000], acción diferente a la inhibición.

### 3.4. El citrato

El citrato es uno de los inhibidores de la litiasis oxalocálcica más estudiados [BAUMANN, 1979; ROBERTSON, 1985; SMITH, 1973]. Se trata de un ácido tricarboxílico débil (pKa de 2.9, 4.3 y 5.6), como puede verse en la Figura 2.13. El efecto del citrato sobre la calculogénesis se atribuye a la combinación de tres aspectos [PAK, 1987; PAK 1991]:



**Figura 2.13.-** Estructura molecular del ácido cítrico.

1.- El metabolismo celular del citrato conduce a la formación de ión bicarbonato, el cual al ser básico provoca un aumento del consumo de protones ( $H^+$ ) a nivel plasmático, disminuyendo así su excreción y, por tanto, un aumento del pH urinario. Por este motivo, el citrato puede disolver los cálculos de ácido úrico y además, evitar la formación de cristales de ácido úrico, que podrían actuar como nucleantes heterogéneos muy efectivos del oxalato cálcico. Sin embargo, la elevación del pH hasta valores próximos a 7 [COE, 2005; JIMÉNEZ, 2001; LEITAO, 2007] puede provocar la insolubilidad de diferentes fosfatos cálcicos (brushita, hidroxiapatita) que, o bien podrían formar cálculos por sí mismos o actuar como nucleantes heterogéneos del oxalato cálcico [CONTE, 1999].

2.- Su capacidad para formar complejos solubles con el ión  $Ca^{2+}$ , provoca una disminución del orden del 20 % de la cantidad de ión calcio libre, con lo que disminuye la sobresaturación de cualquier compuesto insoluble de este ión en orina, sea oxalato o fosfato.

3.- El efecto inhibidor de la cristalización de los oxalatos y fosfatos cálcicos. Este efecto no es muy enérgico, pero debido a que el citrato se puede excretar en concentraciones elevadas, puede llegar a ser importante, sobre todo cuando actúa como inhibidor de la nucleación homogénea de los fosfatos y de la nucleación heterogénea del oxalato cálcico, ya que son etapas cruciales en la formación de los correspondientes cálculos.

Algunos autores han demostrado que el citrato manifiesta efectos inhibidores claros del crecimiento cristalino del oxalato cálcico [BISAZ, 1978; CURRERI, 1981; GRASES, 1988; ROSE, 1982], a través de su enlace con la superficie cristalina. En general se acepta que el citrato presenta una acción inhibidora de la agregación [GRASES, 1990; KULAKSIZOGLU, 2007; TISELIUS, 1993a] y de la formación de cristales de oxalato cálcico [GRASES, 1989b; MARANGELLA, 2004; TISELIUS, 1993b], aunque ésta es limitada si se compara con el fitato [GRASES, 1994c]. A pesar de ello, el citrato inhibe la acción del fosfato cálcico como nucleante heterogéneo [GRASES, 1988; GRASES, 1989c; GRASES, 1991a; GRASES, 1993b] y además, presenta un efecto sinérgico con el pirofosfato en la inhibición de la nucleación de hidroxiapatita [COSTA-BAUZÁ, 2002]. Se ha demostrado que la administración de citrato potásico es efectiva en el control de la evolución de la litiasis residual post-litotricia y de las recidivas litiásicas [JIMÉNEZ, 2001].

Es también un hecho aceptado que los litiásicos eliminan diariamente menor cantidad de citrato que los individuos sanos [ÁLVAREZ-ARROYO, 1992; CONTE, 1989b; DOMRONGKITCHAIPOORN, 2006; ELLIOT, 1972; HODGKINSON, 1962; HOSKING, 1985; MENON, 1983; NICAR, 1983; RUDMAR, 1982; SCWILLE, 1979; SIENER, 2005; TISELIUS, 1993b]. La excreción urinaria de citrato presenta varias peculiaridades, entre ellas que depende de la edad, y generalmente la cantidad eliminada es superior en mujeres que en hombres [ELLIOT, 1972; SCWILLE, 1979]. Por ello, cuando se comparan los valores de citrato de individuos formadores de cálculos con los controles de la misma edad y sexo, la diferencia entre los dos grupos se reduce hasta casi desaparecer [ROBERTSON, 1968].

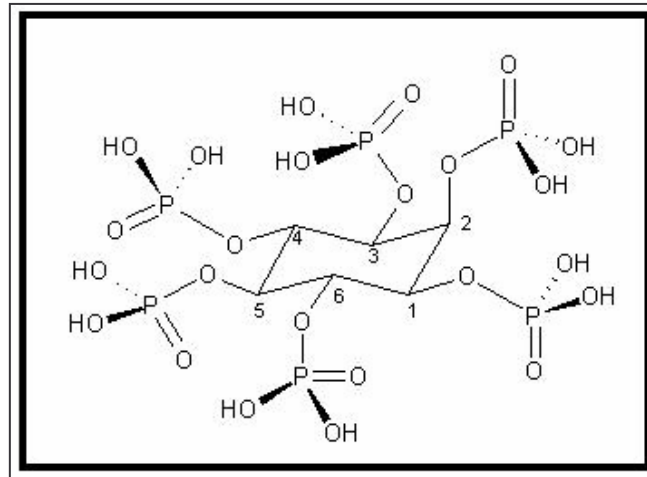
### 3.5. El fitato

A finales de los años 70 y durante los años 80 se postuló la existencia de una sustancia presente en la orina con gran capacidad inhibidora de la cristalización, con propiedades ácidas y de peso molecular relativamente bajo. Se pensó que podía ser un péptido pequeño [BARKER, 1970] o bien fosfocitrato [SALLIS, 1995], pero no se encontraron evidencias definitivas.

Durante los años 90 se demostró que el fitato, una sustancia de peso molecular relativamente bajo, se encuentra presente en la sangre, en la orina y en los fluidos intersticiales e intracelulares [BUNCE, 1993; FRENCH, 1991; GRASES, 1996b; GRASES, 2001a; GRASES, 2001b; GRASES, 2001c; MARCH, 1998], presenta una capacidad inhibidora extraordinaria, y su efecto inhibidor se manifiesta a concentraciones mil veces inferiores al citrato [GRASES, 1989a; GRASES, 1991a, GRASES, 1994a; GRASES, 2000b].



El fitato es *myo*-inositol 1,2,3,4,5,6-hexakis(dihidrogenofosfato) y fue descubierto en el año 1872 por Pfeffer en semillas de vegetales. Sin embargo, no fue hasta el 1914 cuando Anderson estableció la estructura correcta del fitato [ERDMAN, 1979; HARLAND, 1986] (Figura 2.14).



**Figura 2.14.-** Estructura del *myo*-inositol 1,2,3,4,5,6-hexakis(dihidrogenofosfato).

El fitato actúa como inhibidor muy efectivo de la nucleación heterogénea del oxalato cálcico [GRASES, 1991a; GRASES, 1994a; GRASES, 1994c], de la nucleación homogénea de los fosfatos cálcicos [GRASES, 1996c; GRASES, 2000b] y del crecimiento cristalino del oxalato cálcico [GRASES, 1989a].

Se han estudiado *in vitro* los efectos que el fitato ejerce sobre las primeras etapas de la formación de cálculos de oxalato cálcico utilizando sistemas que simulan las condiciones de formación de los cálculos en el interior del riñón [GRASES, 1994a; GRASES, 1994c; GRASES, 1996c; GRASES, 1996a; GRASES, 1998a; GRASES, 1998b]. En ellos se demuestra que el fitato a concentraciones similares a las encontradas normalmente en orina [GRASES, 1996b; GRASES, 2000c] actúa de forma muy efectiva, impidiendo la formación de partículas de fosfato cálcico que podrían impulsar la formación de cristales de oxalato cálcico mediante nucleación heterogénea.

Al considerar la estructura del fitato puede explicarse su potente actividad inhibidora como consecuencia de la afinidad de los grupos fosfatos por el ión calcio. La fuerte adsorción de moléculas de fitato en la superficie de núcleos y/o cristales de oxalato cálcico impedirá su posterior desarrollo y/o crecimiento. Esta acción inhibidora se favorece por la presencia del ión  $Zn^{2+}$ , ya que este ión forma un complejo con el fitato que facilita su adsorción sobre el oxalato [GRASES, 1995].

El hecho de que el fitato esté presente de forma natural en la orina y que su concentración dependa casi exclusivamente del aporte exógeno (dieta) [GRASES, 2000c; GRASES, 2000d; GRASES, 2001a], ha permitido la realización de toda una serie de experimentos *in vivo* que demuestran sus efectos terapéuticos y que apoyan su uso para el tratamiento de la litiasis cálcica.

Así, en un estudio con ratas, a las que se les administró etilenglicol como agente litiasico [GRASES, 1998c], se observó como el fitato dietético disminuía las calcificaciones de la papila renal y la cantidad de calcio total del tejido papilar. También se ha demostrado que la concentración de fitato en enfermos litiasicos presenta valores significativamente más bajos si los comparamos con los obtenidos de individuos sanos [GRASES, 2000c] y que la ingesta de fitato incrementa notablemente la capacidad de la orina de los enfermos litiasicos para inhibir la cristalización de las sales cálcicas (oxalato y fosfato) sin alterar ningún otro parámetro urinario [CONTE, 1999].

Además de su acción inhibidora de la formación de cálculos renales, también presenta una gran inhibición de las calcificaciones patológicas en general; así un estudio hecho con ratas a las cuales se les suministró una dieta sin fitato provocó la aparición de depósitos minerales en la junta corticomedular, mientras que si se añadía un 1% de fitato a la dieta se observaba la ausencia de estos depósitos [GRASES, 2000e]. En otro estudio similar se comprobó como el fitato también inhibía considerablemente las calcificaciones de hidroxapatita (inducidas a nivel subcutáneo) en tejidos blandos tanto mediante administración por vía oral [GRASES, 2004] como por vía tópica [GRASES, 2005a]; sin embargo, debe destacarse que los niveles urinarios de fitato administrado por vía tópica eran un orden de magnitud superiores a los encontrados en las ratas tratadas con dieta con un 1 % de fitato [GRASES, 2005b], hecho que provocó una reducción drástica de las placas de hidroxapatita formadas ( $1.6 \pm 1.1$  mg) si las comparamos con el grupo control ( $26.7 \pm 3.0$  mg) [GRASES, 2005a]. Sin embargo, a través de la administración oral también se conseguía una reducción importante, pasando de  $44.6 \pm 1.5$  mg en el grupo control a  $22.5 \pm 4.9$  mg (cuando la sal utilizada era el fitato sódico) y  $25.9 \pm 2.5$  mg (cuando la sal era la fitina) en los grupos tratados [GRASES, 2004].

La ingesta de pequeñas dosis de fitato (50-100 mg) conduce a una excreción urinaria de 1-10 % de la dosis, porcentaje suficiente para causar la inhibición efectiva de la nucleación heterogénea del oxalato cálcico, así como de su crecimiento cristalino, impidiendo por tanto la formación de este tipo de cálculos y presentando como ventaja muy importante frente al citrato la de no provocar cambios en el pH urinario. Además, la ingesta de 80 mg de fitato puede



incrementar entre un 50-100 % la capacidad inhibidora de la orina emitida en las horas siguientes a su toma [GRASES, 1995].

Así, en la población de Sudáfrica, la incidencia de cálculos renales en la población de origen europeo es superior a la de origen africano, variación que se ha atribuido a una composición urinaria diferente debida a los diferentes hábitos alimentarios (la población africana tiene una fuente importante de fósforo como fitato que no tiene la europea) [MODLIN, 1980]. De hecho, la incidencia de litiasis renal cálcica en los países con un consumo elevado en cereales no refinados (ricos en fitato), es inferior a la de los países más industrializados donde se consumen cereales refinados [ANDERSEN, 1969, ANSARI, 2003; CLEVELAND, 2000; LANG, 2003]. En otro estudio se comprobó que la ingesta de fitato en un grupo de litiásicos oxalocálcicos era inferior comparado con un grupo control [GRIFFITH, 1986].

Más recientemente, Curhan ha llevado a cabo un estudio epidemiológico de 8 años de duración con una muestra de más de 96.000 personas donde se confirma que una dieta rica en fitato se relaciona con una menor incidencia de litiasis renal [CURHAN, 2004].

Además del efecto inhibidor se han descrito otros efectos beneficiosos del fitato, tales como en el tratamiento de la hipercalcemia, el efecto antineoplásico (especialmente propiedades antioxidantes que evitan la formación de radicales libres), efecto sobre enfermedades cardiovasculares (la agregación de plaquetas y la dislipidemia), entre otros, que serán comentados en el capítulo 3 de esta tesis.

## 4. Experimentos *in vitro*

La frecuencia de repetición en la formación de cálculos renales de oxalato cálcico puede llegar a ser de un cálculo cada 3-5 años [SCHNEIDER, 1985], hecho que dificulta bastante la evaluación *in vivo* de la eficacia de un tratamiento para su prevención, así como los factores y/o desencadenantes de la enfermedad. Afortunadamente, hoy en día el conocimiento de la etiología de la formación de los cálculos renales permite utilizar otras alternativas, los experimentos *in vitro*, los cuales ayudan a completar la comprensión del porqué de su formación.

La relevancia de los estudios *in vitro* en urolitiasis depende del grado de correspondencia entre las condiciones experimentales usadas y las existentes en un riñón en

proceso de desarrollo de un cálculo. Para poder obtener datos extrapolables a situaciones reales, el modelo experimental utilizado tiene que reproducir alguna de las etapas del proceso biológico real (normalmente en cada estudio sólo se estudia una fase de la formación del cálculo). El estudio experimental de la formación de sales poco solubles no es simple, y en el caso del oxalato cálcico, que puede precipitar en tres formas cristalinas diferentes (muchas veces de forma simultánea) [GRASES, 2002; KIM, 1982] es aún más difícil. Sin embargo, y debido a su importancia en la urolitiasis, ha sido objeto de estudio por muchos autores.

La mayoría de estudios de cristalización del oxalato cálcico se centran especialmente en el posible efecto inhibitor de los aditivos sobre la nucleación, el crecimiento cristalino y la agregación. Estos estudios son muy importantes, tanto desde el punto de vista de las aplicaciones médicas para el tratamiento de la urolitiasis como desde los aspectos fundamentales de la cristalización. Los métodos de estudio de la cristalización del oxalato cálcico se pueden clasificar en cuatro grandes grupos:

- 1- Estudios generales de cristalización del oxalato cálcico en los cuales no se distingue entre crecimiento cristalino y nucleación, como los realizados en el seno de geles [ACHILLES, 1987; BISAILLON, 1975; LEGEROZ, 1973; SCHNEIDER, 1984].
- 2- Estudios en los que sólo se mide el crecimiento cristalino mediante el uso de cristales preformados y siembra de cristales [BOUROPOULOS, 1998; GRASES, 1988; GRASES, 1989e].
- 3- Estudios que permiten la evaluación de procesos de nucleación independientemente del crecimiento cristalino. Estos estudios se realizan a partir de la medida de los periodos de inducción mediante el uso de técnicas conductimétricas o de dispersión de luz [GUNN, 1972; NAONO, 1967], o mediante la evaluación del número y tamaño de las partículas formadas en una disolución sobresaturada mediante el uso de contadores de partículas [MILLER, 1977; OSSWALD, 1988; ROBERTSON, 1986].
- 4- Estudios de la agregación cristalina del oxalato cálcico. Estos estudios se pueden realizar usando sistemas de recuento de partículas [ROBERTSON, 1986] o a través de observaciones al microscopio [GRASES, 1990].

La distinta estructura interna de los cálculos renales [GRASES, 1996d; GRASES, 1998d; LEUSMANN, 1991; PRIEN, 1947; SÖHNEL, 1995] demuestra que su formación puede tener lugar sobre el epitelio renal (cálculos papilares) o en cavidades renales, por lo que el estudio *in vitro* de su formación se puede clasificar en dos grandes grupos [GRASES, 1998e]:

- a) modelos para estudiar la formación de los cálculos renales papilares: desarrollados sobre el epitelio renal dañado y que se forman fundamentalmente mediante mecanismos de crecimiento cristalino. Entre los modelos de estudio *in vitro* de los cálculos papilares se han desarrollado diferentes sistemas experimentales para estudiar las primeras etapas de formación de los cálculos de COM papilares [GRASES, 1993b; GRASES, 1994c; GRASES, 1996a; GRASES, 1996c; GRASES, 1998b; SÖHNEL, 1993].
- b) modelos para estudiar la formación de los cálculos renales de cavidad: formados en cavidades de baja eficacia urodinámica, en los cuales los procesos de sedimentación pueden jugar un papel importante. Hay un menor número de estudios de formación de cálculos de cavidad, ya que hasta hace poco tiempo, el conocimiento de su mecanismo de formación era prácticamente desconocido.

En un estudio de este tipo (con un montaje similar al utilizado en los trabajos de esta tesis) a pH = 6.9 [GRASES, 1998a], se demuestra que en ausencia de materia orgánica no aparecen depósitos de cristales de fosfatos cálcicos en cavidades de baja eficacia urodinámica y únicamente se forma una capa de HAP sobre las paredes de la cavidad. Sin embargo, en presencia de mucina en la orina se produce su propia calcificación (sobre la mucina se forman esferulitos de HAP), demostrando así la capacidad de los aglomerados de glicoproteínas para actuar como nucleantes heterogéneos de sales cálcicas y el importante papel que juegan en la formación de este tipo de cálculos.

En estos modelos (tanto en los papilares como en los de cavidad) no se han observado diferencias estructurales entre los depósitos cristalinos obtenidos y los cálculos renales humanos, demostrando así la validez de estos sistemas *in vitro* [GRASES, 1998e].

Los estudios que componen este capítulo de la tesis pretenden estudiar la capacidad de diferentes sustancias ( $\text{CaF}_2$ , mucina, detritus celulares) que puedan actuar como nucleantes heterogéneos de la formación de cristales de oxalato cálcico en una cavidad y la influencia de los inhibidores de la cristalización en estos procesos de nucleación heterogénea.

Estudios recientes han demostrado que la capacidad para impedir el desarrollo de concreciones sólidas de un inhibidor de la cristalización se ve muy reducida en zonas/cavidades de baja eficacia urodinámica, donde la orina tiene un tiempo de residencia mayor, si la comparamos con otros estudios en donde se trabaja en condiciones no estáticas [GRASES, 1994c; GRASES, 1996a; GRASES, 1996c]. Estas zonas, especialmente favorables para el desarrollo de cálculos debido a su capacidad para retener partículas sólidas, poseen así otro factor importante de riesgo debido a la reducción de la capacidad de los inhibidores de la cristalización.

## 5. Nucleantes heterogéneos en la litiasis

Es importante recordar que, a pesar de que cualquier orina está sobresaturada con respecto al oxalato cálcico, las concentraciones normales de estas sustancias no son suficientes por si mismas para inducir la formación de cristales de oxalato cálcico (nucleación homogénea), de manera que se necesita un núcleo que sea de diferente composición que el resto del cálculo, tanto en los cálculos de COM papilares como en los de COM de cavidad [BROWN, 1991; FINLAYSON, 1978a; FINLAYSON, 1978b]. Para que este núcleo sea un buen sustrato es necesario que la diferencia de los parámetros de red sea menor del 10 % respecto al COM [TURNBULL, 1952]. Sin embargo, cualquier superficie sólida (independientemente de su composición) en contacto continuo con orina normal actuará más tarde o más temprano como núcleo de un cálculo renal [GRASES, 1994c]. Entre las sustancias que pueden actuar como nucleantes heterogéneos del oxalato cálcico tienen que destacarse [GRASES, 1991b]:

- Los fosfatos cálcicos (brushita e hidroxiapatita) para valores de pH urinario superiores a 6.0 [HOJGAARD, 1999].

- El ácido úrico para valores de pH urinario inferiores a 5.5. La excreción de cantidades importantes de ácido úrico y/o la persistente existencia de valores de pH urinarios ácidos (pH < 5.5) provoca una elevada sobresaturación del ácido úrico en orina, lo que conduce a su separación en forma de fase sólida y posterior acción como nucleante heterogéneo de COM [GRASES, 1991b; GRASES, 1992c; GRASES, 2006; MANDEL, 1981].

- El urato sódico [COE, 1975; GROVER, 1992; PAK, 1975; PAK, 1980]. Sin embargo, la presencia de urato sódico en el corazón de los cálculos de oxalato no es muy frecuente.

- Otros: proteínas, detritus celulares, agregados de glicoproteínas, carbonato cálcico, fármacos, etc [CERINI, 1999; EGAN, 2004; FASSANO, 2001; KHAN, 1995; KHAN, 1997; KHAN, 2002].

En los últimos años se ha detectado un aumento de la cantidad de cálculos renales de COM desarrollados en cavidades de baja eficacia urodinámica, siendo su formación claramente inducida por la presencia de nucleantes heterogéneos en la orina [GRASES, 2002; RAMELLO, 2000].

Hoy en día sabemos que la formación del núcleo heterogéneo dentro del tracto urinario representa la etapa más importante en la constitución de estos tipos de cálculos. Sin embargo, en la década de los 70 y 80 se llevaron a cabo muchos estudios que se centraron en el crecimiento cristalino [GARDNER, 1975; GARDNER, 1978; NANCOLLAS, 1974; WERNESS, 1979] y en la agregación secundaria [HARTEL, 1986; RYALL, 1981b; RYALL, 1986], ambos procesos poco significativos en las primeras etapas de formación del cálculo.

Los estudios actuales sobre la nucleación heterogénea del oxalato cálcico en orina pueden ser clasificados, de acuerdo con el tipo de nucleante heterogéneo, en diferentes grupos. Un grupo estaría formado por proteínas y detritus celulares como nucleantes heterogéneos del oxalato cálcico [CERINI, 1999; GOVINDARAJ, 2001; GRASES, 1996a; GRASES, 1998b; KAVANAGH, 2000; KHAN, 2000; LERNER, 1989; LIESKE, 2000; LIESKE, 2001; YOSHIOKA, 1989]. Diferentes compuestos inorgánicos han sido descritos como nucleantes heterogéneos, por ejemplo fosfatos cálcicos [GRASES, 1994a; GRASES, 1996c; GRASES, 1998d; GROVER, 2002], carbonato cálcico [GEIDER, 1996] y fluoruro cálcico [SINGH, 2001]. El ácido úrico y la cistina constituyen otras sustancias presentes en la orina que reducen drásticamente su solubilidad a pH urinarios por debajo de 5.5, atribuyéndoles una capacidad importante como nucleantes heterogéneos [GRASES, 1991b; MARTINS, 2002].

Finalmente, es un hecho bien conocido que el nuevo diseño de fármacos se caracteriza por una elevada liposolubilidad para conseguir la máxima absorción a través de membranas celulares y, en consecuencia, presentan una baja solubilidad en el agua, lo que aumenta claramente el riesgo de cristalización en orina. Si la cantidad de fármaco excretada es considerable puede generar la típica litiasis medicamentosa, como la asociada al consumo de indinavir o triamtereno [COHEN-SOLAL, 2001; GRASES, 1999b; LYON, 2002]. Sin embargo, si la cantidad excretada no es notable, pueden ser eliminados como cristaluria asintomática, además de inducir la cristalización de COM cuando tiene capacidad para actuar como nucleantes heterogéneos de esta sal, tal y como se observó en la litiasis urinaria de oxalato cálcico inducida por zonisamida en pacientes con epilepsia intratable [KUBOTA, 2000].

Los nucleantes heterogéneos estudiados en esta tesis son varios, intentando abarcar los diferentes grupos considerados por la comunidad científica. Son los siguientes: el fluoruro (compuesto inorgánico), la mucina (una glicoproteína), los detritus celulares, la albúmina (una proteína), la metadona (un fármaco), bacterias y polifenoles (catechin y catechol).

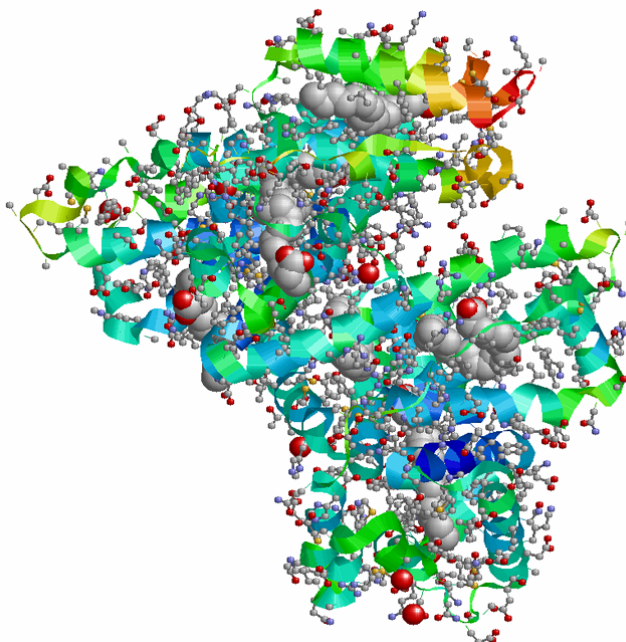
a) El fluoruro: el fluoruro es un anión importante relacionado con la vida y conocido por su participación en procesos de mineralización de los huesos y los dientes. En concentraciones adecuadas el fluoruro protege contra la caries dental, sin embargo, dosis elevadas de este ión pueden inducir toxicidad asociada a diferentes patologías [FEJERSKOV, 1990; WHO, 1986]. En zonas geográficas con elevados contenidos en fluoruro en el agua de bebida se ha detectado una incidencia anormalmente elevada de la litiasis oxalocálcica [AGARWAL, 1997; VALHENSIECK, 1985] (la excreción de fluoruro urinario está relacionada directamente con el nivel de fluoruro presente en el agua de bebida [HEINTZE, 1998]). Sin embargo, otros autores no han encontrado ninguna relación entre el fluoruro ingerido y los cálculos urinarios [TEOTIA, 1983], incluso algunos autores consideran el fluoruro como un inhibidor de la cristalización del oxalato cálcico *in vitro* o en ratas [HERING, 1985; LI, 1992; LOW, 1995].

b) La mucina: la mucina es una glicoproteína de elevado peso molecular que se encuentra en la orina. El papel de las glicoproteínas que provienen del propio urotelio se limita a su acción como nucleante heterogéneo del oxalato cálcico, ya que al ser productos de degradación celular se encuentran generalmente en forma de macroagregados que exhiben una capacidad nucleante importante de sales cálcicas [GRASES, 1998a]. Precisamente debido a este hecho, y a que la presencia de un cálculo constituye un centro continuo de lesión de tejido epitelial (por tanto, de aporte constante de productos de degradación celular de naturaleza glicoproteica), este material constituye una parte muy importante de la materia orgánica encontrada en los cálculos renales (70-80 %) [SARIKA, 1997].

En bibliografía nos encontramos una gran controversia sobre la mucina y otras glicoproteínas sobre sus efectos inhibidores o promotores de la nucleación heterogénea [KUMAR, 1990], hecho por el cual la utilizamos como molécula control para llegar a definir el papel real que presentan estos tipos de sustancias.

c) Los detritus celulares: la orina contiene cantidades variables de naturaleza orgánica que provienen de la degradación celular. Estos detritus pueden ser membranas, restos de membrana o bien glicoproteínas citosólicas que pueden actuar como promotores de la nucleación (los estudios actuales así lo indican [KHAN, 2000]).

d) La albúmina: es una proteína sintetizada en el hígado muy abundante en el plasma sanguíneo, siendo la principal proteína de la sangre (Figura 2.15). La concentración normal de albúmina en sangre humana oscila entre 3.5 y 5.0 gramos por litro y supone alrededor del 50 % de la proteína plasmática. La albúmina es fundamental para el mantenimiento de la presión oncótica, necesaria para la distribución correcta de los líquidos corporales entre el compartimiento intravascular y el extravascular, localizado entre los tejidos. La albúmina tiene carga eléctrica negativa. La membrana basal del glomérulo renal, también está cargada negativamente, lo que impide la filtración glomerular de la albúmina a la orina. Sin embargo, cuando se da el síndrome nefrótico (trastorno que se caracteriza por niveles altos de proteínas en la orina y bajos en sangre, además de hinchazón en tejidos y colesterol alto), esta propiedad es menor, y se pierde gran cantidad de albúmina por la orina, que presenta concentraciones elevadas de dicha proteína.



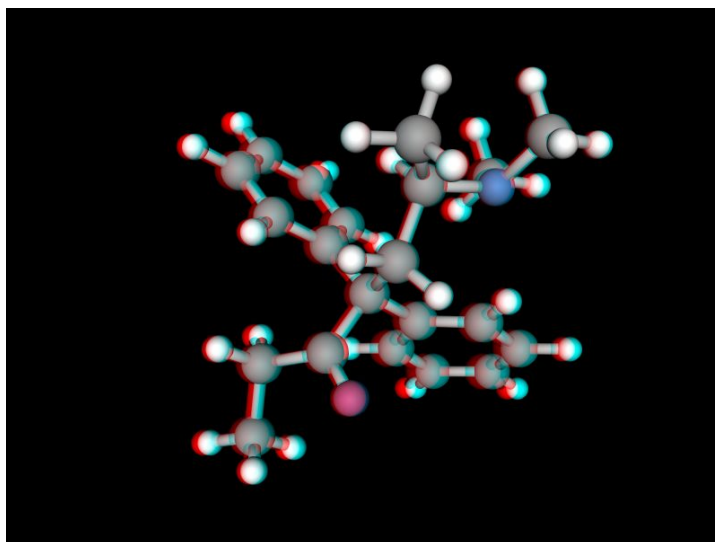
**Figura 2.15.-** Estructura terciaria de la albúmina.

e) La metadona: es una sustancia sintética derivada del opio de distribución restringida y controlada por las autoridades sanitarias. Es un analgésico potente similar a la morfina (también derivado opiáceo), pero sin un efecto sedante tan fuerte. Se utiliza en programas especiales para el tratamiento de la dependencia a la heroína. Neutraliza la euforia de la heroína y evita la aparición del síndrome de abstinencia. Inicialmente se suministran a los adictos dosis diarias equivalentes a su consumo de heroína, con el fin de retirar al adicto lentamente de la heroína ilegal inyectable y posteriormente introducir dosis reducidas de metadona por vía oral.



Su solubilidad en medio acuoso es de 120 g/L; sin embargo se ve muy influenciada por el pH. Así a pH = 6.4, la solubilidad del clorhidrato de metadona se reduce a 44 g/L, mientras que a pH = 7.5 es sólo de 2 g/L. Para calcular la dosis exacta para cada paciente deben tenerse en cuenta la pureza de la heroína de la zona de consumo, el objetivo del tratamiento y que la metadona es un opiáceo de vida media-larga. Hay que tener también presente que para alcanzar concentraciones plasmáticas estables se requiere la administración de dosis repetidas, al menos durante una semana. La dosis habitual suele estar entre 50 y 120 mg/día; sin embargo hay que considerar que aunque es poco frecuente, hay pacientes que pueden necesitar dosis muy elevadas (hasta 1000 mg o más).

En ocasiones, una retirada completa de la metadona no es posible, y la dosis de mantenimiento puede continuar durante meses o años, incluso hay casos que el tratamiento puede ser de por vida. Este largo tratamiento podría provocar que, al igual que con el Indinavir [BRUCE, 1997] llegara a actuar como nucleante heterogéneo de la formación de cálculos renales y provocar un mayor riesgo en los pacientes de sufrir episodios de litiasis (Figura 2.16). Con el Indinavir se llega a un 20 % de los pacientes que lo toman [SCHWARTZ, 1999].

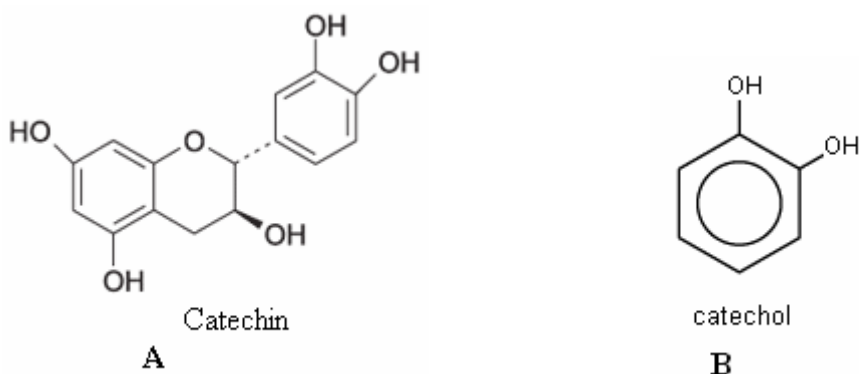


**Figura 2.16.-** Estructura química de la metadona.

f) Polifenoles (catechin y catechol). Los polifenoles son un conjunto heterogéneo de moléculas que poseen en su estructura varios grupos bencénicos sustituidos por funciones hidroxílicas. Son pigmentos naturales que el organismo no puede sintetizar, por lo que deben ser aportados a través de la dieta. Desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo.



El catechin (o catequina), pertenece a la familia de los flavonoides, es un antioxidante presente en muchas plantas, que actúa como inhibidor de varios enzimas (Figura 2.17.A). Se encuentra presente de forma natural en el chocolate [HAMMERSTONE, 2000], frutas, verduras, te y vino [RUIDAVETS, 2000]. De la descomposición del catechin se puede obtener el catechol (Figura 2.17.B). El catechin se elimina principalmente por la orina. La estructura química que presenta le aporta una capacidad muy importante de quelación del hierro y otros metales de transición.



**Figura 2.17.-** A. Estructura química del catechin. B. Estructura química del catechol.

g) Bacterias: generalmente se define por bacteriuria una cantidad mayor de  $10^5$  bacterias/mL de orina, aunque niveles entre  $10^2$  y  $10^5$ /mL de orina pueden indicar infección en algunos pacientes. Un factor de riesgo que podría estar relacionado con la litogénesis sería la existencia de microinfecciones causadas por bacterias de muy pequeño tamaño (nanobacterias), las cuales podrían inducir la formación de nucleantes heterogéneos (estructuras apatíticas) de COM y de ácido úrico [CIFTCIOGLU, 1999; KAJANDER, 1998; KAJANDER, 2001; KAJANDER, 2003; KRAMER, 2000]. Así, en un estudio realizado sobre 1000 cálculos [CONTE, 2001] formados en cavidades de baja eficacia urodinámica y siendo siempre el componente mayoritario el COM y/o el ácido úrico (encontrándose frecuentemente urato amónico como componente minoritario), en un 0.5 % de los casos se detectaron en el centro del cálculo este tipo de bacterias.

## 5.1. Litiasis residual

Hasta principios de la década de los ochenta la litiasis urinaria se resolvía mediante cirugía abierta (excepto la litiasis del uréter pelviano). Con el paso del tiempo el tratamiento de la litiasis urinaria ha sufrido importantes cambios provocados por el progreso de la tecnología. Esencialmente, la aparición de la litotricia extracorpórea por ondas de choque (LEOC) y el perfeccionamiento de los elementos ópticos e instrumentales de la endourología han permitido que la mayoría de las litiasis urinarias puedan resolverse más rápidamente, con menor morbilidad y menor coste que la cirugía abierta.

El 68 % de pacientes que sufren de cálculos urinarios los eliminan de forma espontánea, mientras que el 32 % restante precisa de la extracción del cálculo.

Aproximadamente el 80-85 % de todas las litiasis que requieren de extracción son tratadas con ondas de choque [WICKHAM, 1993], el 10-15 % por técnicas endourológicas, principalmente la nefrolitotomía percutánea (NLP) y la ureteroscopia transuretral (URS), mientras que la cirugía sólo se utiliza entre el 0.1 y el 5.4 % de los casos (cifra variable en función de la habilidad y experiencia del urólogo) [PAIK, 1998; RASSWEILER, 2000].

Cuando la cirugía abierta era el tratamiento estándar para los cálculos renales, la presencia de fragmentos residuales del cálculo indicaba que la intervención había fallado, incluso si dichos fragmentos eran muy pequeños, ya que estos podían actuar como núcleo de nuevas litiasis. Así, se obtenía un 78-93 % de pacientes libres de cálculos [CHARIG, 1986; PREMINGER, 1985b] mientras que con las nuevas técnicas se obtiene un 67-78 % después de tres meses del tratamiento [DRACH, 1986; LINGEMAN, 1994; OBEK, 2001, PEARLE, 1996; RASSWEILER, 2001; ROUSAUD-BARON, 2001]. No obstante, en un estudio a tres años se demuestra que, a pesar de todo, hay un mayor porcentaje de recidivas en los pacientes tratados con cirugía abierta [RASSWEILER, 2000].

La evacuación de los fragmentos generados no siempre es inmediata, habiendo, además, un número significativo de pacientes con fragmentos residuales [OSMAN, 2005]. De esta manera, aunque se han descrito en un 85-90 % de los casos [DRACH, 1986; LINGEMAN, 1986] fragmentaciones eficientes de cálculos con LEOC (fragmentos inferiores a los 5 mm), después de 3 meses del tratamiento de LEOC, los pacientes presentan todavía en un 20-35 % de los casos fragmentos residuales del cálculo [DELVECCHIO, 2000; ROUSAUD-BARON, 2001; ZANETTI, 1988].

No puede hablarse de Litiasis Residual (LR) hasta pasados tres meses de la realización de la LEOC. En muchas ocasiones después de un primer tratamiento con LEOC es necesaria la realización de nuevas sesiones. Se considerará LR cuando no existan variaciones de la litiasis respecto a los resultados obtenidos tras la anterior LEOC tanto en el tamaño como en su localización dentro de la vía urinaria [CANDAU, 2000]. Existe una clara relación entre la presencia de LR y la recurrencia litiásica, ya que estos restos actúan como núcleo de un nuevo crecimiento litiásico.

No hay un acuerdo absoluto en cuanto al tamaño a partir del cual un cálculo residual puede considerarse peligroso o significativo. Generalmente se establece el criterio de considerar litiasis residual no significativa (LRNS) después de LEOC aquellos fragmentos menores de 5 mm asintomáticos, no infectivos ni obstructivos [DELVECCHIO, 2000], considerando que pueden ser expulsados de forma espontánea. Se considera fracaso terapéutico la presencia de LR cuyos fragmentos sean mayores de 5 mm.

Los fragmentos residuales (independientemente de su tamaño) pueden actuar como nucleantes heterogéneos, facilitando así la formación de cálculos. La permanencia de fragmentos residuales post-LEOC durante un período prolongado favorece su función como núcleo para la formación de nuevos cálculos o bien la agregación secundaria de los fragmentos, con la consiguiente formación de un cálculo similar en tamaño al que se fragmentó en un principio, fenómeno que ocurre de manera más notoria cuando la orina del enfermo presenta un riesgo litógeno urinario alto.

Indiscutiblemente, el comportamiento urodinámico concreto en cada caso, facilita o dificulta la expulsión espontánea de los fragmentos, pero además hay otra serie de mecanismos físico-químicos que actúan en la agregación secundaria.

Como ya se ha comentado, la contribución de la agregación secundaria en la génesis de un cálculo (no fragmentado) es poco relevante [GRASES, 1993a; MILLÁN, 1992], excepto en el caso de la litiasis infecciosa, en la que existe una alta concentración de cristales. Después de una LEOC, con los fragmentos litiásicos alojados en una cavidad calicular, se crean las condiciones adecuadas para que se produzca agregación secundaria. Por otra parte, los fragmentos impactados en el urotelio pueden actuar como núcleos heterogéneos de un nuevo cálculo.

El recrecimiento de los cálculos puede llegar a ser muy importante, llegando a aumentar en más de una tercera parte el tamaño inicial del fragmento residual. El porcentaje de

recrecimiento de LRNS varía en función de la serie considerada [CARR, 1996; YU, 1993; ZANETTI, 1997], encontrándose valores de LRNS en bibliografía desde tan sólo un 2 % [BUCHHOLZ, 1997] hasta un 59 % [KHAITAN, 2002].

Hay varios estudios que ponen de manifiesto el riesgo que puede representar la LRNS; en uno de ellos se hizo un seguimiento promedio de 2 años a 160 pacientes, los cuales presentaron en un 43.1 % episodios sintomáticos o requirieron una nueva intervención [STREEM, 1996]. Los riesgos de la LRNS son: la producción de una clínica dolorosa, infección urinaria o recidiva litiásica que requiera manipulación. En otro estudio más reciente con 83 pacientes y un seguimiento promedio de 40 meses se comprobó que en un 37 % de los casos aumentaba el tamaño de la LRNS, siendo necesario someterlos en un 58 % de estos casos a un tratamiento complementario para evitar dicho crecimiento (mayoritariamente otra LEOC o NLP) [CANDAU, 2000].

En otro estudio [ROUSAUD-BARON, 2001] realizado a partir de 1407 pacientes sometidos a LEOC, tres meses después, 244 pacientes (17 %) presentaban litiasis residual cuyos fragmentos eran superiores a 3 mm (mayoritariamente en el cáliz inferior, 69 %). El tamaño inicial de la litiasis antes de la LEOC influyó en la litiasis residual posterior. A estos pacientes con litiasis residual, se les hizo un seguimiento a 5 años, observándose en el 22 % un crecimiento que obligó a un re-tratamiento (generalmente con LEOC). A pesar de ello, sólo un 42 % de los casos re-tratados quedaron definitivamente limpios de litiasis.

Un estudio más reciente [OSMAN, 2005] en el que se hizo un seguimiento a 5 años, se pudo comprobar que en un 21.4 % de los pacientes que presentaban LRNS tuvieron que ser re-tratados al producirse un crecimiento de los fragmentos.

Cuanto mayor sea la masa calcúlosa mayor será la dificultad para expulsar los fragmentos de forma espontánea; sin embargo, la forma en que se produce la fragmentación es más determinante que el tamaño: los cálculos de COD se fragmentan homogéneamente facilitando su arrastre urinario, mientras que los de FAM se fracturan en trozos de distinto tamaño favoreciendo la existencia de LR. No se encuentran diferencias significativas en cuanto a la influencia del tamaño del cálculo residual en la evolución del mismo.

Normalmente los fragmentos tienen una tendencia natural a acumularse en el cáliz inferior, a pesar de tener un tamaño “expulsable” [ELBAHNASY, 1998].

El concepto de dureza del cálculo a las ondas de choque no es determinante a la hora de formarse una LR. En muchas ocasiones los fragmentos de los cálculos residuales son de FAM, que es aparentemente fácil de romper con la LEOC. Este resultado se debe a que normalmente el FAM es un componente habitual de los cálculos coraliformes, normalmente de gran tamaño.

Sin embargo el factor fundamental es la morfología de la vía de excreción. En riñones afectados de anomalías congénitas o adquiridas, las posibilidades de LR se triplican respecto a un riñón normal; influyendo también la diferencia de comportamiento entre riñones intervenidos con anterioridad a la LEOC (46 % de LR) frente a los no operados (19 % LR), ya que la cirugía modifica la conducción condicionando un atrapamiento de fragmentos en el interior de grupos calicilares de difícil drenaje.

Se han descrito recidivas en un 22.2 % de los pacientes un año después de ser tratados con LEOC, porcentaje que aumenta hasta el 34.8 % en un periodo de 2 años [CARR, 1996].

En aquellos casos en que se formen estas LRNS lo ideal para evitar re-tratamientos u otros posibles problemas, sería tomar medidas para evitar que se desarrollen [KAMIHIRA, 1996; OEHLISCHLÄGER, 2003], favoreciendo así su posible expulsión espontánea.

En los últimos años se han usado una variedad de agentes profilácticos para intentar reducir el número de recurrencias en aquellos pacientes tratados con LEOC, tales como las tiazidas y el citrato.

Se han encontrado estudios que utilizan citrato potásico de forma eficaz para el tratamiento de las LRNS cálcicas, tanto en modelos *in vitro* [CHOW, 2004] como *in vivo* [CICERELLO, 1994; SOYGÜR, 2002]. En un estudio clínico de más larga duración (un promedio de casi 30 meses) [JIMÉNEZ, 2001], el uso de citrato potásico fue efectivo, de forma significativa, en el control de la evolución de la LR post-LEOC y de las recidivas litiásicas en un grupo de 100 pacientes afectados de litiasis renal oxalo o fosfatocálcica. En general no obstante, el tratamiento con citrato tiene que ser muy controlado, ya que ocasiona un aumento en el pH urinario, pudiendo llegar a provocar la insolubilidad de diferentes fosfatos cálcicos, principalmente hidroxapatita y brushita [COE, 2005; JIMÉNEZ, 2001; LEITAO, 2007].

En otro estudio más reciente [ARRABAL, 2006] en el que se analiza la evolución de la LR después de LEOC durante tres años, se ha demostrado la eficacia del uso de las tiazidas en el tratamiento de la LR, obteniendo una expulsión total de fragmentos del 72 % frente al 36 % del

grupo control (no tratado). Además, en el grupo control, en un 58 % de ellos la LR sufrió un crecimiento (un 72.4 % de ellos tuvieron que ser sometidos a nuevas sesiones de LEOC), mientras que en el grupo tratado con tiazidas solamente un 18 % de ellos sufrió un crecimiento de la LR (tratados todos ellos con nuevas LEOCs).

Por este motivo, en esta tesis se ha estudiado el efecto inhibitor que pueden desempeñar diferentes sustancias encontradas normalmente en orina (fitato, citrato y pirofosfato) [*GRASES, 2000c; GRASES, 2001a; KATO, 2004; MARCH, 2001; ROBERTS, 1992; RUTSCH, 2000; SIENER, 2004*] que permitan demorar o frenar completamente el recrecimiento de la LRNS.

## BIBLIOGRAFÍA

- [ACHILLES, 1987] Achilles W (1987) Crystallization in gel matrices. A new experimental model of calcium stone formation. *Contrib Nephrol* **58**, 59-64.
- [AGARWAL, 1997] Agarwal V, Vaish AK, Vaish P (1997) Groundwater quality: focus on fluoride and fluorosis in Rajasthan. *Curr Sci* **73**, 743-746.
- [AKINCI, 1991] Akinci M, Esen T, Kocak T, Ozsoy C, Tellaloglu S (1991) Role of inhibitor deficiency in urolithiasis. *Eur Urol* **19**, 240-243.
- [ÁLVAREZ-ARROYO, 1992] Álvarez-Arroyo MV, Traba ML, Rapado A, de la Piedra C (1992) Role of citric acid in primary hyperparathyroidism with renal lithiasis. *Urol Res* **20**, 88-90.
- [ANDERSEN, 1969] Andersen DA (1969) Historical and geographical differences in the pattern of incidence of urinary stones considered in relation to possible aetiological factors. En: Renal Stone Research (Hodgkinson A, Nordin BEC, eds.) pp 7-16, Churchill, Londres.
- [ANSARI, 2003] Ansari MS, Gupta NP (2003) Impact of socioeconomic status in etiology and management of urinary stone disease. *Urol Int* **70**, 255-261.
- [ANGELL, 1989] Angell AH, Resnick MI (1989) Surface interaction between glycosaminoglycans and calcium oxalate. *J Urol* **141**, 1255-1258.
- [ARRABAL, 2006] Arrabal-Martín M, Fernández-Rodríguez A, Arrabal-Polo MA, García-Ruiz MJ, Zuluaga-Gómez (2006) Extracorporeal renal lithotripsy: evolution of residual lithiasis treated with tiazides. *Urology* **68**, 956-959.
- [ASPLIN, 1998] Asplin JR, Arsenault D, Parks JH, Coe FL, Hoyer JR (1998) Contribution of human uropontin to inhibition of calcium oxalate crystallization. *Kidney Int* **53**, 194-199.
- [BARCELÓ, 1993] Barceló P, Wuhl O, Servitge E, Rousaud A, Pak CYC (1993) Randomized double-blind study of potassium citrate in idiopathic hypocitraturic calcium nephrolithiasis. *J Urol* **150**, 1761-1764.

- [BARKER, 1970] Barker LM, McPhillips JJ, Lawrence GD, Doty SB, Pallante SL, Bills CE, Scott WW, Howard JE (1970) Studies on mechanisms of calcification. I. Properties of urinary derivatives which inhibits cartilage calcification. II. Electron microscopic observations of the effect of inhibitors in crystal formation. *Johns Hopkins Med* **127**, 2-22.
- [BAUMANN, 1979] Baumann JM, Wacker M (1979) Experiences with the measurement of inhibitory activity of urine and crystallisation inhibitors by different techniques. *Urol Res* **7**, 183-188.
- [BAUMANN, 1985] Baumann JM, Lauber K, Lustenberger FX, Wacker M, Zingg EJ (1985) Crystallization conditions in urine of patients with idiopathic recurrent calcium nephrolithiasis and with hyperparathyroidism. *Urol Res* **13**, 169-174.
- [BISAILLON, 1975] Bisailon SR, Tawashi R (1975) Growth of calcium oxalate in gel systems. *J Pharm Sci* **64**, 958-961.
- [BISAZ, 1978] Bisaz S, Felix R, Neuman WF, Fleisch H (1978) Quantitative determination of inhibitors of calcium phosphate precipitation in whole urine. *Miner Electrolyte Metab* **1**, 74-83.
- [BLIZNAKOV, 1965] Bliznakov G (1965) Sur le mecanisme de l'action des additifs adsorbants dans la croissance cristalline. *En: Adsorption et Croissance Cristalline* (Centre National de la Recherche Scientifique Ed.) pp 291-301, Paris.
- [BOUROPOULOS, 1998] Bouropoulos K, Bouropoulos N, Melekos M, Koutsoukos PG, Chitanu GC, Anghelescu-Dogaru AG, Carpov AA (1998) The inhibition of calcium oxalate monohydrate crystal growth by maleic acid copolymers. *J Urol* **159**, 1755-1761.
- [BROWN, 1991] Brown CM, Ackermann DK, Purich DL, Finlayson B (1991) Nucleation of calcium oxalate monohydrate: use of turbidity measurements and computer-assisted simulations in characterizing early events in crystal formation. *J Cryst Growth* **108**, 455-464.



- [BRUCE, 1997] Bruce RG, Munch LC, Hoven AD, Jerauld RS, Greenburg R, Porter WH, Rutter PW (1997) Urolithiasis associated with the protease inhibitor indinavir. *Urology* **50**, 513-518.
- [BUCHHOLZ, 1997] Buchholz NP, Meier-Padel S, Rutishauser G (1997) Minor residual fragments after extracorporeal shockwave lithotripsy: spontaneous clearance or risk factor for recurrent stone formation? *J Endourol* **11**, 227-232.
- [BUNCE, 1993] Bunce CM, French PJ, Allen P, Mountford JC, Moor B, Greaves MF, Michel RH, Brown G (1993) Comparison of the levels of inositol metabolites in transformed haemopoietic cells and their normal counterparts. *Biochem J* **289**, 667-673.
- [CANDAU, 2000] Candau C, Saussine C, Lang H, Roy C, Faure F, Jacqmin D (2000) Natural history of residual renal stone fragments after ESWL. *Eur Urol* **37**, 18-22.
- [CARR, 1996] Carr LK, D'A Honey J, Jewett MA, Ibanez D, Ryan M, Bombardier C (1996) New stone formation: a comparison of extracorporeal shock wave lithotripsy and percutaneous nephrolithotomy. *J Urol* **155**, 1565-1567.
- [CARVALHO, 2002] Carvalho M, Mulinari RA, Nakawaga Y (2002) Role of Tamm-Horsfall protein and uromodulin in calcium oxalate crystallization. *Braz J Med Biol Res* **35**, 1165-1172.
- [CAUDARELLA, 1983] Caudarella R, Stefani F, Rizzoli E, Malavolta N, Dántuono G (1983) Preliminary results of glycosaminoglycans excretion in normal and stone forming subjects: relationship with uric acid excretion. *J Urol* **129**, 665-667.
- [CAUDARELLA, 1988] Caudarella R, Rizzoli E, Malavolta N (1988) Clinical and metabolic aspects of urinary glycosaminoglycans excretion in calcium stones formers. En: *Inhibitors of crystallization in renal lithiasis and their clinical application* (Martelli A, Buli P, Mardiesiui B, eds.) pp 187-192, Acta Med, Roma.

- [CERINI, 1999] Cerini C, Geider S, Dussol B, Hennequin C, Daudon M, Veessler S, Nitsche S, Boistelle R, Berthezene P, Dupuy P, Vazi A, Berland Y, Dagorn JC, Verdier JM (1999) Nucleation of calcium oxalate crystals by albumin: involvement in the prevention of stone formation. *Kidney Int* **55**, 1776-1786.
- [CHARIG, 1986] Charig CR, Webb DR, Payne SR, Wickham JEA (1986) Comparison of treatment of renal calculi, by open surgery, PNL and ESWL. *B Med J* **292**, 879-882.
- [CHOW, 2004] Chow K, Dixon J, Gilpin S, Kavanagh JP, Rao PN (2004) Citrate inhibits growth of residual fragments in an in vitro model of calcium oxalate renal stones. *Kidney Int* **65**, 1724-1730.
- [CICERELLO, 1994] Cicerello E, Merlo F, Gambaro G, Maccatrozzo L, Fandella A, Baggio B, Anselmo G (1994) Effect of alkaline citrate therapy on clearance of residual renal stone fragments after extracorporeal shock wave lithotripsy in sterile calcium and infection nephrolithiasis patients. *J Urol* **151**, 5-9.
- [CIFTCIOGLU, 1999] Ciftcioglu N, Björklund M, Kuorikoski K, Bergström K, Kajander EO (1999) Nanobacteria: an infectious cause for kidney stone formation. *Kidney Int* **56**, 1893-1898.
- [CLEVELAND, 2000] Cleveland LE, Moshfegh AJ, Albertson AM, Goldman JD (2000) Dietary intake of whole grains. *J Am Coll Nutr* **19**, 331S-338S.
- [COE, 1975] Coe FL, Lawton RL, Goldstein RB (1975) Sodium urate accelerates precipitation of calcium oxalate *in vitro*. *Proc Soc Exp Biol Med* **149**, 926-929.
- [COE, 2005] Coe FL, Evan A, Worcester E (2005) Kidney stone disease. *J Clin Invest* **115**, 2598-2608.
- [COHEN-SOLAL, 2001] Cohen-Solal F, Abdelmoula J, Hoarau MP, Jungers P, Lacour B, Daudon M (2001) Urinary lithiasis of medical origin. *Therapie* **56**, 743-750.

- [CONTE, 1989a] Conte A, Roca P, Genestar C, Grases F (1989) The relation between orthophosphate and pyrophosphate in normal subjects and in patients with urolithiasis. *Urol Res* **17**, 173-175.
- [CONTE, 1989b] Conte A, Roca P, Gianotti M, Grases F (1989) On the relation between citrate and calcium in normal and stone former subjects. *Int Urol Nephrol* **21**, 369-373.
- [CONTE, 1999] Conte A, García-Raja A, Grases F, Costa-Bauzá A, Prieto RM (1999) Urinary lithogen risk test: usefulness in the evaluation of renal lithiasis treatment using crystallization inhibitors. *Arch Esp Urol* **52**, 305-310.
- [CONTE, 2001] Conte A, Grases F, Costa-Bauzá A, Pizá P (2001) Microinfecciones y litiasis renal. *Arch Esp Urol* **54**, 855-860.
- [COSTA-BAUZÁ, 2002] Costa-Bauzá A, Barceló C, Perelló J, Grases F (2002-2003) Synergism between the brushite and hydroxyapatite urinary crystallization inhibitors. *Int Urol Nephrol* **34**, 447-451.
- [CRAWFORD, 1968] Crawford JE, Crematy EP, Alexander AE (1968) The effect of natural and synthetic polyelectrolites on the crystallization of calcium oxalate. *Aust J Chem* **21**, 1067-1072.
- [CURHAN, 2004] Curhan GC, Willett WC, Knight EL, Stampfer MJ (2004) Dietary factors and the risk of incident kidney stones in younger women: Nurses' Health Study II. *Arch Intern Med* **164**, 885-891.
- [CURRERI, 1981] Curreri PA, Onoda G, Finlayson BJ (1981) A comparative appraisal of adsorption of citrate on whewellite seed crystals. *J Cryst Growth* **53**, 209-214.
- [DANES, 1967] Danes BS, Bearn AG (1967) The effect of retinal (vitamin A-alcohol) on urinary excretion of mucopolysaccharides in Hurler syndrome. *Lancet* **1**, 1029-1031.
- [DELVECCHIO, 2000] Delvecchio F, Preminger G (2000) Management of residual stones. *Urol Clin North Am* **27**, 347-354.

- [DESMARS, 1973] Desmars JF, Tawashi R (1973) Dissolution and growth of calcium oxalate monohydrate. I. Effect of magnesium and pH. *Biochim Biophys Acta* **313**, 256-267.
- [DOMRONGKITCHAIPOORN, 2006] Domrongkitchaiporn S, Stitchantrakul W, Kochakarn W (2006) Causes of hypocitraturia in recurrent calcium stone formers: focusing on urinary potassium excretion. *Am J Kidney Dis* **48**, 546-564.
- [DOYLE, 1991] Doyle IR, Ryall RL, Marshall VR (1991) Inclusion of proteins into calcium oxalate crystals precipitated from human urine: a highly selective phenomenon. *Clin Chem* **37**, 1589-1594.
- [DRACH, 1980] Drach GW, Thorson S, Randolph A (1980) Effects of urinary organic macromolecules on calcium oxalate monohydrate crystal growth. *J Urol* **139**, 190-195.
- [DRACH, 1986] Drach GW, Dretler S, Fair W, Finlayson B, Gillenwater J, Griffith D, Lingeman J, Newman D (1986) Report of the United States cooperative study of extracorporeal shock wave lithotripsy. *J Urol* **135**, 1127-1133.
- [EBISUNO, 1999] Ebisuno S, Nishihata M, Inagaki T, Umehara M, Kohjimoto Y (1999) Bikunin prevents adhesion of calcium oxalate crystal to renal tubular cells in human urine. *J Am Soc Nephrol* **14**, S436-440.
- [EDYVANE, 1987] Edyvane KA, Hibberd CM, Harnett RM, Marshall VR, Ryall RL (1987) Macromolecules inhibit calcium oxalate growth and aggregation in whole human urine. *Clin Chim Acta* **167**, 329-338.
- [EGAN, 2004] Egan TJ, Rodgers AL, Siele T (2004) Nucleation of calcium oxalate crystals on an imprinted polymer surface from pure aqueous solution and urine. *J Biol Inorg Chem* **9**, 195-202.
- [ELBAHNASY, 1998] Elbahnasy AM, Shalhav AL, Hoenig DM, Elashry OM, Smith DS, McDougall EM, Clayman RV (1998) Lower caliceal stone clearance after shock wave lithotripsy or ureteroscopy: the impact of lower pole radiographic anatomy. *J Urol* **159**, 676-682.

- [ELLIOT, 1972] Elliot JS, Ribeiro ME (1972) The urinary excretion of citric, hippuric and lactic acid in normal adults and in patients with calcium oxalate urinary calculus disease. *Invest Urol* **10**, 102-106.
- [ERDMAN, 1979] Erdman LW (1979) Oilseed phytate: nutritional implications. *J Am Oil Chem Soc* **56**, 736-741.
- [ERTURK, 2002] Erturk E, Kiernan M, Schoen SR (2002) Clinical association with urinary glycosaminoglycans and urolithiasis. *Urology* **59**, 495-499.
- [FASSANO, 2001] Fassano JM, Khan SR (2001) Intratubular crystallization of calcium oxalate in the presence of membranes vesicles: an in vitro study. *Kidney Int* **59**, 169-178.
- [FEJERSKOV, 1990] Fejerskov O, Manji F, Baelum V (1990) The nature and mechanisms of dental fluorosis in man. *J Dent Res* **69**, 692-721.
- [FELIX, 1977] Felix R, Monod A, Broge L, Hansen NM, Fleisch H (1977) Aggregation of calcium oxalate crystals: effect of urine and various inhibitors. *Urol Res* **5**, 21-28.
- [FELLSTRÖM, 1985a] Fellström B, Danielson BG, Ljunghall S, Wikström B (1985) En: Urolithiasis and related clinical research (Schwille PO, Smith LH, Robertson WG, Vahlensieck W, eds) pp 811-890, Plenum Press, New York.
- [FELLSTRÖM, 1985b] Fellström B, Danielson BG, Lindsjö M, Ljunghall S, Wikström B (1985) The mechanism of glycosaminoglycan inhibition of calcium oxalate crystal growth. *Fortschr Urol Nephrol* **23**, 24-26.
- [FINLAYSON, 1978a] Finlayson B (1978) Physicochemical aspects of urolithiasis. *Kidney Int* **13**, 344-360.
- [FINLAYSON, 1978b] Finlayson B, Reid F (1978) The expectation of free and fixed particles in urinary stone disease. *Invest Urol* **15**, 442-448.
- [FLEISCH, 1962] Fleisch H, Bisaz S (1962) Isolation from urine of pyrophosphate, a calcification inhibitor. *Am J Physiol* **203**, 671-675.

- [FLEISCH, 1964] Fleisch H, Bisaz S (1964) The inhibitory effect of pyrophosphate on calcium oxalate precipitation and its relation to urolithiasis. *Experientia* **20**, 276-280.
- [FLEISCH, 1966] Fleisch H, Russell RG, Straumann F (1966) Effect of pyrophosphate on hydroxyapatite and its implications in calcium homeostasis. *Nature* **212**, 901-903.
- [FLEISCH, 1967] Fleisch H, Bisaz S, Russell RG (1967) Influence of pyrophosphate on the crystallisation of uric acid and magnesium ammonium phosphate and its implications in phosphate therapy for urolithiasis. *Urol Int* **22**, 483-491.
- [FRENCH, 1991] French PJ, Bunce CM, Stephens LR, Lord JM, McConnell FM, Brown G, Creba JA, Michell RH (1991) Changes in the levels of inositol lipids and phosphates during the differentiation of HL60 promyelocytic cells towards neutrophils or monocytes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **245**, 193-201.
- [GARDNER, 1975] Gardner GL (1975) Nucleation and crystal growth of calcium oxalate trihydrate. *J Cryst Growth* **30**, 158-168.
- [GARDNER, 1978] Gardner GL (1978) Effect of pyrophosphate and phosphonate anions on the crystal growth kinetics of calcium oxalate hydrates. *J Phys Chem* **82**, 664-670.
- [GEIDER, 1996] Geider S, Dussol B, Nitsche S, Veessler S, Berthezene P, Dupuy P, Astier JP, Boistelle R, Berland Y, Dagorn JC, Verdier JM (1996) Calcium carbonate crystals promote calcium oxalate crystallization by heterogeneous or epitaxial nucleation: Possible involvement in the control of urinary lithogenesis. *Calcif Tissue Int* **59**, 33-37.
- [GOLDBERG, 1972] Goldberg JM, Cotlier E (1972) Specific isolation and analysis of mucopolysaccharides (glycosaminoglycans) from human urine. *Clin Chim Acta* **41**, 19-27.
- [GOVINDARAJ, 2001] Govindaraj A, Selvam R (2001) Increased calcium oxalate crystal nucleation and aggregation by peroxidized protein of human kidney stone matrix and renal cells. *Urol Res* **29**, 194-198.

- [GRASES, 1988] Grases F, Millán A, García-Raso A (1988) Polyhydroxycarboxylic acids as inhibitors of calcium oxalate crystal growth; relation between inhibitory capacity and chemical structure. *J Cryst Growth* **89**, 496-500.
- [GRASES, 1989a] Grases F, March P (1989) A study about some phosphate derivatives as inhibitors of calcium oxalate crystal growth. *J Cryst Growth* **96**, 993-995.
- [GRASES, 1989b] Grases F, Genestar C, Conte A, March P, Costa-Bauzá A (1989) Inhibitory effect of pyrophosphate, citrate, magnesium and chondroitin sulphate in calcium oxalate urolithiasis. *Br J Urol* **64**, 235-237.
- [GRASES, 1989c] Grases F, Gil JJ, Conte A (1989) Urolithiasis inhibitors and calculus nucleation. *Urol Res* **17**, 163-166.
- [GRASES, 1989d] Grases F, Gil JJ, Conte A (1989) Glycosaminoglycans: inhibition of calcium oxalate crystalline growth and promotion of crystal aggregation. *Colloids Surf* **36**, 29-38.
- [GRASES, 1989e] Grases F, Genestar C, Millán A (1989) The influence of some metallic ions and their complexes on the kinetics of crystal growth of calcium oxalate. *J Cryst Growth* **94**, 507-594.
- [GRASES, 1990] Grases F, Costa-Bauzá A (1990) Study of factors affecting calcium oxalate crystalline aggregation. *Br J Urol* **66**, 240-244.
- [GRASES, 1991a] Grases F, Costa-Bauzá A (1991) Potentiometric study of the nucleation of calcium oxalate in presence of several additives. *Clin Chem Enzym Comms* **3**, 319-328.
- [GRASES, 1991b] Grases F, Costa-Bauzá A, March JG, Masárová L (1991) Glycosaminoglycans, uric acid and calcium oxalate urolithiasis. *Urol Res* **19**, 375-380.
- [GRASES, 1992a] Grases F, Millán A, Söhnle O (1992) Role of agglomeration in calcium oxalate monohydrate urolith development. *Nephron* **61**, 145-150.
- [GRASES, 1992b] Grases F, Masárová L, Söhnle O, Costa-Bauzá A (1992) Agglomeration of calcium oxalate monohydrate in synthetic urine. *Br J Urol* **70**, 240-246.

- [GRASES, 1992c] Grases F, Conte A (1992) Urolithiasis, inhibitors and promoters. *Urol Res* **20**, 86-88.
- [GRASES, 1993a] Grases F, Söhnle O (1993) Mechanism of oxalocalcic renal calculi generation. *Int Urol Nephrol* **25**, 209-214.
- [GRASES, 1993b] Grases F, Costa-Bauzá A, March JG, Söhnle O (1993) Artificial simulation of renal stone formation. Influence of some urinary components. *Nephron* **65**, 77-81.
- [GRASES, 1994a] Grases F, Kroupa M, Costa-Bauzá A (1994) Studies on calcium oxalate monohydrate crystallization: influence of inhibitors. *Urol Res* **22**, 39-43.
- [GRASES, 1994b] Grases F, Llompart I, Conte A, Coll R, March JG (1994) Glycosaminoglycans and oxalocalcic urolithiasis. *Nephron* **68**, 449-453.
- [GRASES, 1994c] Grases F, Costa-Bauzá A, March JG (1994) Artificial simulation of the early stages of renal stone formation. *Br J Urol* **74**, 298-301.
- [GRASES, 1995] Grases F, García-Ferragut L, Costa-Bauzá A (1995) A new procedure to evaluate the inhibitory capacity of calcium oxalate crystallization in whole urine. *Int Urol Nephrol* **27**, 653-661.
- [GRASES, 1996a] Grases F, García-Ferragut L, Costa-Bauzá A (1996) Study of the early stages of renal stone formation: experimental model using urothelium of pig urinary bladder. *Urol Res* **24**, 305-311.
- [GRASES, 1996b] Grases F, Llobera A (1996) Determination of phytic acid in urine by ICP Atomic Emission Spectrometry. *Anal Letts* **29**, 1193-1199.
- [GRASES, 1996c] Grases F, García-Ferragut L, Costa-Bauzá A, March JG (1996) Study of the effects of different substances on the early stages of papillary stone formation. *Nephron* **73**, 561-568.
- [GRASES, 1996d] Grases F, Söhnle O, Villacampa AI, March JG (1996) Phosphates precipitating from artificial urine and fine structure of phosphate renal calculi. *Clin Chim Acta* **244**, 45-67.



- [GRASES, 1998a] Grases F, Llobera A (1998) Experimental model to study sedimentary kidney stones. *Micron* **29**, 105-111.
- [GRASES, 1998b] Grases F, García-Ferragut L, Costa-Bauzá A (1998) Development of calcium oxalate crystals on urothelium: effect of free radicals. *Nephron* **78**, 296-301.
- [GRASES, 1998c] Grases F, García-González R, Torres JJ, Llobera A (1998) Effects of phytic acid on renal stone formation in rats. *Scand J Urol Nephrol* **32**, 261-265.
- [GRASES, 1998d] Grases F, Costa-Bauzá A, García-Ferragut L (1998) Biopathological crystallization: a general view about the mechanisms of renal stone formation. *Adv Colloid Interface Sci* **74**, 169-194.
- [GRASES, 1998e] Grases F, Prieto RM, Costa-Bauzá A (1998) *In vitro* models for studying renal stone formation: a clear alternative. *ATLA* **26**, 481-503.
- [GRASES, 1999a] Grases F, Ramis M, Villacampa AI, Costa-Bauzá A (1999) Uric acid urolithiasis crystallization inhibitors. *Urol Int* **62**, 201-204.
- [GRASES, 1999b] Grases F, Costa-Bauzá A, García-González R, Payeras A, Bassa A, Torres JJ, Conte A (1999) Indinavir crystallization and Urolithiasis. *Int Urol Nephrol* **31**, 23-29.
- [GRASES, 2000a] Grases F, Costa-Bauzá A, Söhnle O (2000) *Cristalización en disolución* (Reverté ed) Barcelona.
- [GRASES, 2000b] Grases F, Ramis M, Costa-Bauzá A (2000) Effects of phytate and pyrophosphate on brushite and hydroxyapatite crystallization. Comparison with the action of other polyphosphates. *Urol Res* **28**, 136-140.
- [GRASES, 2000c] Grases F, March JG, Prieto RM, Simonet BM, Costa-Bauzá A, García-Raja A, Conte A (2000) Urinary phytate in calcium oxalate stone formers and healthy people. Dietary effects on phytate excretion. *Scand J Urol Nephrol* **34**, 162-164.

- [GRASES, 2000d] Grases F, Simonet BM, March JG, Prieto RM (2000) Inositol hexakisphosphate in urine: the relationship between oral intake and urinary excretion. *BJU Int* **85**, 138-142.
- [GRASES, 2000e] Grases F, Prieto RM, Simonet BM, March JG (2000) Phytate prevents tissue calcifications in female rats. *Biofactors* **11**, 171-177.
- [GRASES, 2001a] Grases F, Simonet BM, Vucenik I, Prieto RM, Costa-Bauzá A, March JG, Shamsuddin AM (2001) Absorption and excretion of orally administered inositol hexaphosphate (IP6 or phytate) in humans. *Biofactors* **15**, 53-61.
- [GRASES, 2001b] Grases F, Simonet BM, Prieto RM, March JG (2001) Phytate levels in diverse rat tissues: influence of dietary phytate. *Br J Nutr* **86**, 1-8.
- [GRASES, 2001c] Grases F, Simonet BM, Prieto RM, March JG (2001) Variation of InsP<sub>4</sub>, InsP<sub>5</sub> and InsP<sub>6</sub> levels in tissues and biological fluids depending on dietary phytate. *J Nutr Biochem* **12**, 595-601.
- [GRASES, 2002] Grases F, Costa-Bauzá A, Ramis M, Montesinos V, Conte A (2002) Simple classification of renal calculi closely related to their micromorphology and etiology. *Clin Chim Acta* **322**, 29-36.
- [GRASES, 2004] Grases F, Perelló J, Prieto RM, Simonet BM, Torres JJ (2004) Dietary *myo*-inositol hexaphosphate prevents dystrophic calcifications in soft tissues: a pilot study in Wistar rats. *Life Sci* **75**, 11-19.
- [GRASES, 2005a] Grases F, Perelló J, Isern B, Prieto RM (2005) Study of a *myo*-inositol hexaphosphate based cream to prevent dystrophic calcinosis cutis. *Br J Dermatol* **152**, 1022-1025.
- [GRASES, 2005b] Grases F, Perelló J, Isern B, Prieto RM (2005) Study of the absorption of *myo*-inositol hexakisphosphate (InsP<sub>6</sub>) through the skin. *Biol Pharm Bull* **28**, 764-767.
- [GRASES, 2006] Grases F, Sanchis P, Perelló J, Costa-Bauzá (2006) Role of uric acid in different types of calcium oxalate renal calculi. *Int J Urol* **13**, 252-256.

- [GRIFFITH, 1986] Griffith HM, Oshea B, Maguire M, Koegh B, Kevany JP (1986) A case-control study of dietary intake of renal stone patients. II. Urine biochemistry and stone analysis. *Urol Res* **14**, 75-82.
- [GROVER, 1990] Grover PK, Ryall RL, Marshall VR (1990) Does Tamm-Horsfall mucoproteína inhibit or promote calcium oxalate crystallization in human urine? *Clin Chim Acta* **190**, 223-238.
- [GROVER, 1992] Grover PK, Ryall RL, Marshall VR (1992) Calcium oxalate crystallization in urine: role of urate and glycosaminoglycans. *Kidney Int* **41**, 149-154.
- [GROVER, 1998] Grover PK, Moritz RL, Simpson RJ, Ryall RL (1998) Inhibition of growth and aggregation of calcium oxalate crystals in vitro—a comparison of four human proteins. *Eur J Biochem* **253**, 637-644.
- [GROVER, 2002] Grover PK, Kim DS, Ryall RL (2002) The effect of seed crystals of hydroxyapatite and brushite on the crystallization of calcium oxalate in undiluted human urine in vitro: implications for urinary stone pathogenesis. *Mol Med* **8**, 200-209.
- [GUNN, 1972] Gunn DJ, Murthy MS (1972) Kinetics and mechanisms of precipitations. *Chem Eng Sci* **27**, 1293-1313.
- [HALLSON, 1982] Hallson PC, Rose GA, Sulaiman S (1982) Urate does not influence the formation of calcium oxalate crystals in whole human urine at pH 5.3. *Clin Sci* **62**, 421-425.
- [HAMMERSTONE, 2000] Hammerstone JF, Lazarus SA, Schmitz HH (2000) Procyanidin content and variation in some commonly consumed foods. *J Nutr* **130**, 2086S-2092S.
- [HARANGI, 1996] Harangi F, Gyorke Z, Melegh B (1996) Urinary glycosaminoglycan excretion in healthy and stone-forming children. *Pediatr Nephrol* **10**, 555-558.
- [HARLAND, 1986] Harland BF, Oberleas D (1986) Anion exchange method for determination of phytate in foods: a collaborative study. *J Assoc Off Anal Chem* **69**, 667- 670.

- [HARTEL, 1986] Hartel RWE, Gottung BE, Randolph AD, Drach GW (1986) Mechanism and kinetic modeling of calcium oxalate crystal aggregation in a urine-like liquor. I: Mechanism. II. Kinetic modeling. *AIChE J* **32**, 1176-1180; 1186-1189.
- [HEINTZE, 1998] Heintze SD, Bastos JR, Bastos R (1998) Urinary fluoride levels and prevalence of dental fluorosis in three Brazilian cities with different fluoride concentrations in the drinking water. *Community Dent Oral Epidemiol* **26**, 316-323.
- [HERING, 1985] Hering F, Briellmann T, Seiler H, Rutishauser G (1985) Fluoridation of drinking water: effects of kidney stone formation. *Urol Res* **13**, 175-178.
- [HESS, 1989] Hess B, Nakagawa Y, Coe FL (1989) Inhibition of calcium oxalate monohydrate crystal aggregation by urine proteins. *Am J Physiol* **257**, F99-106.
- [HESS, 1991] Hess B (1991) The role of Tamm-Horsfall glycoprotein and nephrocalcin in calcium oxalate monohydrate crystallization processes. *Scanning Microsc* **5**, 689-696.
- [HESS, 1992] Hess B (1992) Tamm-Horsfall glycoprotein-inhibitor or promoter of calcium oxalate monohydrate crystallization processes? *Urol Res* **20**, 83-86.
- [HESSE, 1986] Hesse A, Wuzel H, Vahlensieck W (1986) The excretion of glycosaminoglycans in the urine of calcium-oxalate stone patients and healthy persons. *Urol Int* **41**, 81-87.
- [HESSE, 1991] Hesse A, Wuzel H, Vahlensieck W (1991) Significance of glycosaminoglycans for the formation of calcium oxalate stones. *Am J Kidney Dis* **17**, 414-419.
- [HODGKINSON, 1962] Hodgkinson A (1962) Citric acid excretion in normal adults and in patients with renal calculi. *Clin Sci* **23**, 203-212.

- [HOJGAARD, 1999] Hojgaard I, Fornander AM, Nilsson MA, Tiselius HG (1999) Crystallization during volume reduction of solutions with a composition corresponding to that in the collecting duct: the influence of hydroxyapatite seed crystals and urinary macromolecules. *Urol Res* **27**, 417-425.
- [HOSKING, 1985] Hosking DH, Wilson JW, Liedtke RR, Smith LH, Wilson DM (1985) Urinary citrate excretion in normals and patients with idiopathic calcium urolithiasis. En: Urolithiasis and related clinical research (Schwille PO, Smith LH, Robertson WG, Vahlensieck W, eds.) pp 367-370, Plenum Press, New York.
- [HOWARD, 1958] Howard JE, Thomas WC (1958) Some observations on rachitic rat cartilage of probably significance in the etiology of renal calculi. *Trans Am Clin Climatol Assoc* **70**, 94-102.
- [HOWARD, 1967] Howard JE, Thomas WC, Barker LM, Smith LH, Wadkins CL (1967) The recognition and isolation from urine and serum of a peptide inhibitor to calcification. *Johns Hopkins Med J* **120**, 119-136.
- [HOYER, 1995] Hoyer JR (1995) Uropontin in urinary calcium stone formation. *Miner Electrolyte Metab* **20**, 385-392.
- [JIMÉNEZ, 2001] Jiménez A, Arrabal M, Mijan JL, Hita E, Palao F, Zuluaga A (2001) Efecto del citrato potásico en la profilaxis de la litiasis urinaria. *Arch Esp Urol* **54**, 1036-1046.
- [JONES, 1989] Jones AG (1989) Agglomeration during crystallization and precipitation from solution. 5th Int Symp on Agglomeration, 131-143, Symp Ser, Rugby.
- [KAJANDER, 1998] Kajander EO, Ciftcioglu N (1998) Nanobacteria: an alternative mechanism for pathogenic intra- and extracellular calcification and stone formation. *Proc Natl Acad Sci* **95**, 8274-8279.
- [KAJANDER, 2001] Kajander EO, Ciftcioglu N, Millar-Hjelle MA, Hjelle JT (2001) Nanobacteria: controversial pathogens in nephrolithiasis and polycystic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **10**, 445-452.

- [KAJANDER, 2003] Kajander EO, Ciftcioglu N, Aho K, García-Cuerpo E (2003) Characteristics of nanobacteria and their possible role in stone formation. *Urol Res* **31**, 47-54.
- [KAMIHIRA, 1996] Kamihira O, Ono Y, Katoh N, Yamada S, Mizutani K, Ohshima S (1996) Long-term stone recurrence rate after extracorporeal shock wave lithotripsy. *J Urol* **156**, 1267-1271.
- [KATO, 2004] Kato Y, Yamaguchi S, Yachiku S, Nakazono S, Hori J, Wada N (2004) Changes in urinary parameters after oral administration of potassium-sodium citrate and magnesium oxide to prevent urolithiasis. *Urology* **63**, 7-12.
- [KAVANAGH, 2000] Kavanagh JP, Jones L, Rao PN (2000) Calcium oxalate crystallization kinetics studied by oxalate-induced turbidity in fresh human urine and artificial urine. *Clin Sci* **98**, 151-158.
- [KHAITAN, 2002] Khaitan A, Gupta NP, Hemal AK, Dogra PN, Seth A, Aron N (2002) Post-ESWL, clinically insignificant residual stones: reality or myth? *Urology* **59**, 20-24.
- [KHAN, 1995] Khan SR (1995) Heterogeneous nucleation of calcium oxalate crystals in mammalian urine. *Scanning Microsc* **9**, 597-614.
- [KHAN, 1997] Khan SR (1997) Calcium phosphate/calcium oxalate crystal association in urinary stones: implications for heterogeneous nucleation of calcium oxalate. *J Urol* **157**, 376-383.
- [KHAN, 2000] Khan SR, Maslamani SA, Atmani F, Glenton PA, Opalko FJ, Thamilselvan S, Hammett-Stabler C (2000) Membranes and their constituents as promoters of calcium oxalate crystal formation in human urine. *Calcif Tissue Int* **66**, 90-96.
- [KHAN, 2002] Khan SR, Glenton PA, Backov R, Talham DR (2002) Presence of lipids in urine, crystals and stones: implications for the formation of kidney stones. *Kidney Int* **62**, 2062-2072.
- [KIM, 1982] Kim MK (1982) The stones. *Scanning Electron Microsc* **IV**, 1635-1660.

- [KLEINMAN, 2004] Kleinman JG, Wesson JA, Hughes J (2004) Osteopontin and calcium stone formation. *Nephrol Physiol* **98**, 43-47.
- [KOK, 1988] Kok DJ, Papapoulos SE, Blomen LJ, Bijvoet OL (1988) Modulation of calcium oxalate monohydrate crystallization kinetics in vitro. *Kidney Int* **34**, 346-350.
- [KONYA, 2003] Konya E, Umekawa T, Iguchi M, Kurita T (2003) The role of osteopontin on calcium oxalate crystal formation. *Eur Urol* **43**, 564-571.
- [KRAMER, 2000] Kramer G, Klingler HC, Steiner GE (2000) Role of bacteria in the development of kidney stones. *Curr Opin Urol* **10**, 35-38.
- [KUBOTA, 2000] Kubota M, Nishi-Nagase M, Sakakihara Y, Noma S, Nakamoto M, Kawaguchi H, Yanagisaya M (2000) Zonisamide – induced urinary lithiasis in patients with intractable epilepsy. *Brain Dev* **22**, 230-233.
- [KULAKSIZOGLU, 2007] Kulaksizoglu S, Sofikerim M, Cevik C (2007) Impact of various modifiers on calcium oxalate crystallization. *Int J Urol* **14**, 214-218.
- [KUMAR, 1990] Kumar S, Muchmore A (1990) Tamm-Horsfall protein-uromodulin (1950-1990). *Kidney Int* **37**, 1395-1401.
- [KUMAR, 2003] Kumar C, Farrel G, Lieske JC (2003) Whole urinary proteins coat calcium oxalate monohydrate crystals to greatly decrease their adhesion to renal cells. *J Urol* **170**, 221-225.
- [KUMAR, 2005] Kumar V, Pena L, Farrel G, Lieske JC (2005) Urinary macromolecular inhibition of crystal adhesion to renal epithelial cells is impaired in male stone formers. *Kidney Int* **68**, 1784-1792.
- [LAMINSKI, 1990] Laminski NA, Meyers AM, Sonnekus MI, Smyth AE (1990) Prevalence of hypocitraturia and hypopyrophosphaturia in recurrent calcium stone formers: as isolated defects or associated with other metabolic abnormalities. *Nephron* **56**, 379-386.
- [LANG, 2003] Lang R, Thane CW, Bolton-Smith C, Jebb SA (2003) Consumption of whole-grain foods by British adults: findings from further analysis of two national dietary surveys. *Public Health Nutr* **6**, 479-484.

- [LANZALACO, 1988] Lanzalaco AC, Singh RP, Smesko SA, Nancollas GH, Sufrin G, Binette M, Binette JP (1988) The influence of urinary macromolecules on calcium oxalate monohydrate crystal growth. *J Urol* **139**, 190-195.
- [LEGEROZ, 1973] LeGeroz RZ, Morales P (1973) Renal stone crystal grown in gel systems. *Invest Urol* **11**, 12-16.
- [LEITAO, 2007] Leitao V, Halebian GE, Robinson MR, Pierre SA, Sur RL, Preminger GM (2007) Does potassium citrate medical therapy increase the risk of calcium phosphate stone formation? *AIP Conference Proceedings* **900**, 428-431.
- [LERNER, 1989] Lerner SP, Gleeson J, Griffith DP (1989) Infection stones. *J Urol* **141**, 753-758.
- [LEUSMANN, 1991] Leusmann DB (1991) A classification of urinary calculi with respect to their composition and micromorphology. *Scand J Urol* **25**, 141-150.
- [LI, 1985] Li MK, Blacklock NJ, Garside J (1985) Effects of magnesium on calcium oxalate crystallization. *J Urol* **133**, 123-125.
- [LI, 1992] Li LC, Zhang YS, Hu RZ, Zhou XC (1992) Inhibitory effect of fluoride on renal stone formation in rats. *Urol Int* **48**, 336-341.
- [LIESKE, 2000] Lieske JC, Toback FG (2000) Renal cell-urinary crystal interactions. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **9**, 349-355.
- [LIESKE, 2001] Lieske JC, Toback FG, Deganello S (2001) Sialic acid-containing glycoproteins on renal cells determine nucleation of calcium oxalate dihydrate crystals. *Kidney Int* **60**, 1784-1791.
- [LINGEMAN, 1986] Lingeman JE, Newman D, Mertz JH, Mosbaugh PG, Steele RE, Kahnoski RJ, Coury TA, Woods JR (1986) Extracorporeal shock wave lithotripsy: the Methodist Hospital of Indiana experience. *J Urol* **135**, 1134-1137.
- [LINGEMAN, 1994] Lingeman JE, Siegel YI, Steele B, Nyhuis AW, Woods JR (1994) Management of lower pole nephrolithiasis: a critical analysis. *J Urol* **151**, 663-667.



- [LOW, 1995] Low RK, Ho S, Stoller ML (1995) Sodium fluoride dissolution of human calcium oxalate/phosphate stone particles. *J Endourol* **9**, 379-382.
- [LYON, 2002] Lyon AW, Mansoor A, Trotter MJ (2002) Urinary gems: acyclovir crystalluria. *Arch Pathol Lab Med* **126**, 753-754.
- [MANDEL, 1981] Mandel NS, Mandel GS (1981) Epitaxis between stone-forming crystals at the atomic level. En: Urolithiasis: clinical and basic research (Smith LH, Robertson WG, Finlayson B, eds.) pp 469-471, Plenum Press, New York.
- [MARANGELLA, 2004] Marangella M, Bagnis C, Bruno M, Vitale C, Petrarulo M, Ramello A (2004) Crystallization inhibitors in the pathophysiology and treatment of nephrolithiasis. *Urol Int* **72**, 6-10.
- [MARCH, 1998] March JG, Simonet BM, Grases F, Salvador A (1998) Indirect determination of phytic acid in urine. *Anal Chim Acta* **367**, 36-38.
- [MARCH, 2001] March JG, Simonet BM, Grases F (2001) Determination of pyrophosphate in renal calculi and urine by means of an enzymatic method. *Clin Chim Acta* **314**, 187-194.
- [MARTELLI, 1985] Martelli A, Marchesini B, Muli P, Lambertini F, Rusconi R (1985) Urinary excretion pattern of main glycosaminoglycans in stone formers controls. En: Urolithiasis and related clinical research (Schwille PO, Smith LH, Robertson WG, Vahlensieck W, eds.) pp 355-358, Plenum Press, New York.
- [MARTIN, 1984] Martin X, Werness PG, Bergert JH, Smith LH (1984) Pentosan polysulphate as an inhibitor of calcium oxalate crystal growth. *J Urol* **132**, 786-788.
- [MARTINS, 2002] Martins MC, Meyers AA, Whalley NA, Rodgers AL (2002) Cystine: a promoter of the growth and aggregation of calcium oxalate crystals in normal undiluted human urine. *J Urol* **167**, 317-321.
- [MEDETOGNON-BENISSAN, 1999] Medetognon-Benissan J, Tardivel S, Hennequin C, Daudon M, Drueke T, Lacour B (1999) Inhibitory effect of bikunin on calcium

- oxalate crystallization in vitro and urinary bikunin decrease in renal stone formers. *Urol Res* **27**, 69-75.
- [MENON, 1983] Menon M, Mahle CJ (1983) Urinary citrate excretion in patients with renal calculi. *J Urol* **129**, 1158-1160.
- [MEYER, 1974] Meyer JL, McCall JT, Smith LH (1974) Inhibition of calcium phosphate crystallization by nucleoside phosphates. *Calcif Tissue Res* **15**, 287-293.
- [MEYER, 1975] Meyer JL, Smith LH (1975) Growth of calcium oxalate crystals. I. A model for urinary stone growth. *Invest Urol* **13**, 31-35.
- [MEYER, 1985] Meyer JL (1985) Relative importance of calcium phosphate urinary inhibitors. En: Urolithiasis and related clinical research (Schwille PO, Smith LH, Robertson WG, Vahlensieck W, eds.) pp 811-814, Plenum Press, New York.
- [MILLÁN, 1992] Millán A, Grases F, Söhnel O, Krivánková I (1992) Semi-batch precipitation of calcium oxalate monohydrate. *Crystal Res Technol* **27**, 31-39.
- [MILLER, 1977] Miller JD, Randolph AD, Drach GW (1977) Observations upon calcium oxalate crystallization kinetics in simulated urine. *J Urol* **117**, 342-345.
- [MIYAKE, 1998] Miyake O, Yoshimura K, Yoshioka T, Koide T, Okuyama A (1998) High urinary excretion level of citrate and magnesium in children: potential etiology for the reduced incidence of pediatric urolithiasis. *Urol Res* **26**, 209-213.
- [Mo, 2004] Mo L, Huang HY, Zhu XH, Shapiro E, Hasty DL, Wu XR (2004) Tamm-Horsfall protein is a critical renal defense factor protecting against calcium oxalate crystal formation. *Kidney Int* **66**, 1159-1166.
- [MODLIN, 1980] Modlin M (1980) Urinary phosphorylated inositols and renal stone. *Lancet* **2**, 1113-1114.
- [NAKAGAWA, 1981] Nagakawa Y, Margolis HC, Yokoyama S, Kezdy FJ, Kaiser ET, Coe FL (1981) Purification and characterization of a calcium oxalate crystal growth inhibitor from rat kidney tissue culture medium. *J Biol Chem* **256**, 3936-3944.

- [NAKAGAWA, 1984] Nagakawa Y, Abram V, Coe FL (1984) Isolation of calcium oxalate crystal growth inhibitor from rat kidney and urine. *Am J Physiol* **247**, F765-F772.
- [NANCOLLAS, 1974] Nancollas GH, Gardner GL (1974) Kinetics of crystal growth of calcium oxalate monohydrate. *J Cryst Growth* **21**, 267-276.
- [NAONO, 1967] Naono H (1967) The effect of triphosphate on the crystallization of strontium sulfate. *Bull Chem Soc Japan* **40**, 1104-1110.
- [NICAR, 1983] Nicar MJ, Skurla C, Sakhaee K, Pak CYC (1983) Low urinary citrate excretion in nephrolithiasis. *Urology* **21**, 8-14.
- [NICAR, 1986] Nicar MJ, Hsu MC, Fetner C (1986) Urinary response to oral potassium citrate therapy for urolithiasis in a private practice setting. *Clin Ther* **8**, 219-222.
- [NORMAN, 1984] Norman RW, Scurr DS, Robertson WG, Peacock M (1984) Inhibition of calcium oxalate cristallisation by pentosan polysulphate in control subjects and stone formers. *Br J Urol* **56**, 594-598.
- [OBEK, 2001] Obek C, Onal B, Kantay K, Kalkan M, Yalcin V, Oner A, Solok V, Tansu N (2001) The efficacy of extracorporeal shock wave lithotripsy for isolated lower pole calculi compared with isolated middle and upper caliceal calculi. *J Urol* **166**, 2081-2085.
- [OEHLISCHLÄGER, 2003] Oehlschläger C, Albrecht S, Hakenberg OW, Schrödter S, Froehner M, Manseck A, Wirth MP (2003) Early changes of oxalate and calcium urine excretion in those with calcium oxalate stone formation after extracorporeal shock wave lithotripsy. *Urology* **62**, 17-21.
- [OMBRA, 2003] Ombra MN, Casula S, Biino G, Maestrale G, Cardia F, Melis P, Pirastu M (2003) Urinary glicosaminoglycans as risk factors for uric acid nephrolithiasis: case control study in a Sardinian genetic isolate. *Urology* **62**, 416-420.
- [OSMAN, 2005] Osman MM, Alfano Y, Kamp S, Haecker A, Alken P, Michel MS, Knoll T (2005) 5-year-follow-up of patients with clinically insignificant

- residual fragments after extracorporeal shockwave lithotripsy. *Eur Urol* **47**, 860-864.
- [OSSWALD, 1988] Osswald H, Weinheimer G, Schütt ID, Ernst W (1988) Effective prevention of calcium oxalate crystal formation *in vitro* and *in vivo* by pentosan polysulphate. *Urol Res* **16**, 230-235.
- [PAIK, 1998] Paik ML, Wainstein MA, Spinak JP, Hampel N, Resnick MI (1998) Current indications for open stone surgery in the treatment of renal and ureteral calculi. *J Urol* **159**, 374-378.
- [PAK, 1975] Pak CYC, Arnold LH (1975) Heterogeneous nucleation of calcium oxalate by seeds of monosodium urate. *Proc Soc Exp Biol Med* **149**, 930-932.
- [PAK, 1980] Pak CYC, Holt K, Britton F, Peterson R, Crowther C, Ward D (1980) Assessment of pathogenic roles of uric acid, monopotassium urate, monoammonium urate and monosodium urate in hyperuricosuric calcium oxalate nephrolithiasis. *Miner Electrolyte Metab* **4**, 130.
- [PAK, 1985] Pak CYC, Fuller C, Sakhaee K, Preminger GM, Britton F (1985) Long-term treatment of calcium nephrolithiasis with potassium citrate. *J Urol* **134**, 11-15.
- [PAK, 1987] Pak CYC, Adams BV (1987) Potassium citrate therapy of nephrolithiasis. En: Renal stone disease, pp 201-224, Boston.
- [PAK, 1991] Pak CYC (1991) Citrate and renal calculi. New insights and future directions. *Am J Kidney Dis* **17**, 420-425.
- [PEARLE, 1996] Pearle M, Clayman R (1996) Outcomes and selection of surgical therapies of stones in the kidney and ureter. En: Kidney stones, medical and surgical management. (Coe F, Favus J, Pak C, Parks J y Preminger G) pp 709-755, Lippincot-Raven Publishers Saunders, Philadelphia.
- [PÉREZ, 2001] Pérez FJ, Arrabal M, Ocete C, Arias JJ, García-Valdecasas J, Rodríguez A, Zuluaga A (2001) Glicosaminoglicanos urinarios tras litotricia extracorporea por ondas de choque en pacientes con litiasis renal. *Arch Esp Urol* **54**, 875-883.

- [PREMINGER, 1985a] Preminger GM, Sakhaee K, Skurla C, Pak CYC (1985) Prevention of recurrent calcium stone formation with potassium citrate therapy in patients with distal renal tubular acidosis. *J Urol* **134**, 20-24.
- [PREMINGER, 1985b] Preminger GM, Clayman RV, Hardeman SW, Franklin J, Curry T, Peters PC (1985) Percutaneous nephrostolithotomy vs open surgery for renal calculi. *JAMA* **245**, 1054-1058.
- [PRIEN, 1947] Prien EL, Frondel C (1947) Studies in urolithiasis. I. The composition of urinary calculi. *J Urol* **57**, 949-994.
- [RAMELLO, 2000] Ramello A, Vitale C, Marangella M (2000) Epidemiology of nephrolithiasis. *J Nephrol* **3**, S45-50.
- [RASSWEILER, 2000] Rassweiler J, Renner C, Eisemberg (2000) The management of complex renal stones. *BJU Int* **86**, 919-928.
- [RASSWEILER, 2001] Rassweiler J, Renner C, Chaussy C, Thuroff S (2001) Treatment of renal stones by extracorporeal shockwave lithotripsy - An update. *Eur Urol* **39**, 187-199.
- [ROBERTS, 1992] Roberts NB, Durton J, Helliwell T, Rothwell PJ, Kavanagh JP (1992) Pyrophosphate in synovial fluid and urine and its relationship to urinary risk factors for stone disease. *Ann Clin Biochem* **29**, 529-534.
- [ROBERTSON, 1968] Robertson WG, Peacock M, Nordin BE (1968) Activity products in stone-forming and non-stone-forming urine. *Clin Sci* **32**, 579-594.
- [ROBERTSON, 1973] Robertson WG, Peacock M, Nordin BE (1973) Inhibitors of the growth and aggregation of calcium oxalate crystals in vitro. *Clin Chim Acta* **43**, 31-37.
- [ROBERTSON, 1978] Robertson WG, Peacock M, Heyburn PJ, Marshall DH, Clark PB (1978) Risk factors in calcium stone disease of the urinary tract. *Br J Urol* **50**, 449-454.
- [ROBERTSON, 1985] Robertson WG, Peacock M (1985) Pathogenesis of urolithiasis. En: Urolithiasis: etiology. Diagnosis (Schneider HJ, Peacock M, Robertson WG, Vahlensieck W, eds.) p 185-334 Springer Verlag, Berlin.

- [ROBERTSON, 1986] Robertson WG, Scurr DS (1986) Modifiers of calcium oxalate crystallization found in urine. I. Studies with a continuous crystallizer using an artificial urine. *J Urol* **135**, 1322-1326.
- [ROMERO, 1997] Romero MC, Nocera S, Nesse AB (1997) Decreased Tamm-Horsfall protein in lithiasic patients. *Clin Biochem* **30**, 63-67.
- [ROSE, 1982] Rose GA, Hallson PC (1982) Renal stone formation. The inhibitory effect of urine on calcium oxalate precipitation. *Fortschr Urol Nephrol* **22**, 484-488.
- [ROUSAUD-BARON, 2001] Rousaud Baron A; Millán F; Izquierdo de la Torre F; Rousaud F; López Llauradó H; Martí Malet J; de la Torre Holguera P (2001) Analysis and clinical course of residual lithiasis after shock wave renal treatment. *Arch Esp Urol* **54**, 1009-1016.
- [RUDMAR, 1982] Rudmar D, Kutner MH, Redd SC, Waters WC, Geron GG, Blerer J (1982) Hypocitraturia in calcium nephrolithiasis. *J Clin Endocrinol Metab* **55**, 1052-1067.
- [RUIDAVETS, 2000] Ruidavets JB, Teissedre PI, Ferrieres J, Carando S, Bougard G, Cabanis JC (2000) Catechin in the Mediterranean diet: vegetable, fruit or wine? *Atherosclerosis* **153**, 101-117.
- [RUTSCH, 2000] Rutsch F, Schauerte P, Kalhoff H, Petrarulo M, August C, Diekmann L (2000) Low levels of urinary inorganic pyrophosphate indicating systemic pyrophosphate deficiency in a boy with idiopathic infantile arterial calcification. *Acta Pediatr* **89**, 1265-1269.
- [RYALL, 1981a] Ryall RL, Harnett RM, Marshall VR (1981) The effect of urine, pyrophosphate, citrate, magnesium and glycosaminoglycans on the growth and aggregation of calcium oxalate crystals in vitro. *Clin Chim Acta* **112**, 349-356.
- [RYALL, 1981b] Ryall RL, Ryall RG, Marshall VR (1981) Interpretation of particle growth and aggregation pattern obtained from the Coulter-counter. A simple theoretical model. *Invest Urol* **18**, 396-400.

- [RYALL, 1983] Ryall RL, Marshall VR (1983) The value of the 24-hour urine analysis in the assessment of stone-formers attending a general hospital outpatient clinic. *Br J Urol* **55**, 1-5.
- [RYALL, 1986] Ryall RL, Ryall RG, Marshall VR (1986) A computer model for the determination of extents of growth and aggregation of crystals from changes in their size distribution. *J Cryst Growth* **76**, 290-298.
- [RYALL, 1995] Ryall RL, Grover PK, Stapleton AM, Barrell DK, Tang Y, Simpson RJ (1995) The urinary F1 activation peptide of human prothrombin is a potent inhibitor of calcium oxalate crystallization in undiluted human urine in vitro. *Urol Res* **89**, 533-541.
- [RYALL, 2005] Ryall RL, Chauvet MC, Grover PK (2005) Intracrystalline proteins and urolithiasis: a comparison of the protein content and ultrastructure of urinary calcium oxalate monohydrate and dihydrate crystals. *BJU Int* **96**, 654-663.
- [SALLIS, 1979] Sallis JD, Lumley MF (1979) On the possible role of glycosaminoglycans as natural inhibitors of calcium oxalate stones. *Invest Urol* **16**, 296-299.
- [SALLIS, 1985] Sallis JD (1985) En: Urolithiasis and related clinical research (Schwille PO, Smith LH, Robertson WG, Vahlensieck W, eds) pp 803-809, Plenum Press, New York.
- [SALLIS, 1995] Sallis JD, Parry NFG, Meehan JD, Kamperman H, Anderson ME (1995) Controlling influence of phosphocitrate *in vitro* and *in vivo* on calcium oxalate crystal formation and growth. *Scanning Microsc* **9**, 127-136.
- [SARIG, 1973] Sarig S, Raphael M, Ron A (1973) Calcium oxalate crystallization from inhibited solutions. *Isr J Chem* **11**, 635-643.
- [SARIKA, 1997] Sarika K, Turkolmez K, Kupeli B, Akpoyraz M, Durak I, Kupeli S, Kosar A (1997) Glycosaminoglycans content of Ca-oxalate stone matrix. *Urol Int* **58**, 43-46.

- [SASO, 1998] Saso L, Valentini G, Casini ML, Mattei E, Panzironi C, Silvestrini B (1998) Development of a turbidimetric assay to study the effect of urinary components on calcium oxalate precipitation. *Urol Int* **60**, 47-52.
- [SCHEPERS, 2002] Schepers MS, van der Boom BG, Romijn JC, Schroder FH, Verkoelen CF (2002) Urinary crystallization inhibitors do not prevent crystal binding. *J Urol* **167**, 1844-1847.
- [SCHNEIDER, 1984] Schneider HJ, Roehrborn CG, Rugendorff EW (1984) A gel model for measuring crystallization inhibitor activities in calcium oxalate urolithiasis. En: Urinary Stone (Ryall R, Brockis JG, Marshall V, Finlayson B, eds.) pp 202-206, Churchill Livingstone, New York.
- [SCHNEIDER, 1985] Schneider HJ (1985) Urolithiasis: etiology. Diagnosis. En: Handbook of urology pp 137-145 Springer-Verlag, Berlin.
- [SCHWARTZ, 1999] Schwartz BF, Schenkman N, Armenakas NA, Stoller ML (1999) Imaging characteristics of indinavir calculi. *J Urol* **161**, 1085-1087.
- [SCWILLE, 1979] Scwille PO, Scholz D, Paulus M, Engelhardt W, Sigel A (1979) Citrate in daily and fasting urine. *Invest Urol* **16**, 457-462.
- [SEE, 1992] See WA, Williams RD (1992) Urothelial injury and clotting cascade activation: common denominators in particulate adherence to urothelial surfaces. *J Urol* **147**, 541-548.
- [SENTHIL, 1996] Senthil D, Subha K, Saravanan N, Varalakshmi P (1996) Influence of sodium pentosan polysulphate and certain inhibitors on calcium oxalate crystal growth. *Mol Cell Biochem* **156**, 31-35.
- [SHARMA, 1992] Sharma S, Vaidyanathan S, Thind SK, Nath R (1992) Urinary excretion of inorganic pyrophosphate by normal subjects and patients with renal calculi in north-western India and the effect of diclofenac sodium upon urinary excretion of pyrophosphate in stone formers. *Urol Int* **48**, 404-408.
- [SHUM, 1993] Shum DK, Dohel MD (1993) Separate effects of urinary chondroitin sulphate and heparan sulphate upon the crystallization of urinary



calcium oxalate: differences between stone formers and normal controls. *Clin Sci* **85**, 33-39.

- [SIDHU, 1989] Sidhu H, Hernal AK, Thind SK, Nath R, Vaidyanathan S (1989) Comparative study of 24-hour urinary excretion of glycosaminoglycans by renal stone formers and healthy adults. *Eur Urol* **16**, 45-47.
- [SIENER, 2004] Siener R, Jahnen A, Hesse A (2004) Influence of a mineral water rich in calcium, magnesium and the risk of calcium oxalate crystallization. *J Clin Nutr* **58**, 270-276.
- [SIENER, 2005] Siener R, Schade N, Nicolay C, von Unruh GE, Hesse A (2005) The efficacy of dietary intervention on urinary risk factors for stone formation in recurrent calcium oxalate stone patients. *J Urol* **173**, 1601-1605.
- [SINGH, 2001] Singh PP, Barjatiya MK, Dhing S, Bhatnagar R, Kothari S, Dhar V (2001) Evidence suggesting that high intake of fluoride provokes nephrolithiasis in tribal populations. *Urol Res* **29**, 238-244.
- [SMITH, 1973] Smith LH, Meyer JL, McCall JT (1973) Chemical nature of crystal inhibitors isolated from human urine. En: Urinary calculi, Karger, Basilea.
- [SÖHNEL, 1993] Söhnel O, Grases F, March JG (1993) Experimental technique simulating oxalocalcic renal stone generation. *Urol Res* **21**, 95-99.
- [SÖHNEL, 1995] Söhnel O, Grases F (1995) Calcium oxalate monohydrate renal calculi. Formation and development mechanism. *Adv Colloid Interface Sci* **59**, 1-17.
- [SOYGÜR, 2002] Soygür T, Akbay A, Kupeli S (2002) Effect of potassium citrate therapy on stone recurrence and residual fragments after shockwave lithotripsy in lower caliceal calcium oxalate urolithiasis: a randomized controlled trial. *J Endourol* **16**, 149-152.
- [STREEM, 1996] Stroom SB, Yost A, Mascha E (1996) Clinical implications of clinically insignificant stone fragments after extracorporeal shock wave lithotripsy. *J Urol* **155**, 1186-1190.

- [SUTOR, 1969] Sutor DJ (1969) Growth studies of calcium oxalate in the presence of various ions and compounds. *Br J Urol* **41**, 171-178.
- [SUZUKI, 1996] Suzuki K, Ryall RL (1996) The effect of heparan sulphate on the crystallization of calcium oxalate in undiluted, ultrafiltered human urine. *Br J Urol* **78**, 15-21.
- [TEOTIA, 1983] Teotia M, Teotia SPS, Singh DP, Singh CV (1983) Chronic ingestion of natural fluoride and endemic bladder stone disease. *Indian Pediatr* **20**, 637-642.
- [TERKELTAUB, 2001] Terkeltaub RA (2001) Inorganic pyrophosphate generation and disposition in pathophysiology. *Am J Physiol Cell Physiol* **281**, 1-11.
- [TISELIUS, 1985] Tiselius HG (1985) The effect of sodium sulphopentosan on the crystallization of calcium oxalate. En: Urolithiasis and related clinical research (Schwille PO, Smith LH, Robertson WG, Vahlensieck W, eds) pp 895-898, Plenum Press, New York.
- [TISELIUS, 1993a] Tiselius HG, Fornander AM, Nilsson MA (1993) The effects of citrate and urine on calcium oxalate crystal aggregation. *Urol Res* **21**, 363-366.
- [TISELIUS, 1993b] Tiselius HG, Berg C, Fornander AM, Nilsson MA (1993) Effects of citrate on the different phases of calcium oxalate crystallization. *Scanning Microsc* **7**, 381-390.
- [TRINCHIERI, 1991] Trinchieri A, Mandresini A, Luongo P, Longo G, Pisani E (1991) The influence of diet on urinary risk factors for stones in healthy subjects and idiopathic renal calcium stone formers. *Br J Urol* **67**, 230-236.
- [TSUJIHATA, 2000] Tsujihata M, Miyake O, Yoshimura K, Kakimoto KI, Takahara S, Okuyama A (2000) Fibronectin as a potent inhibitor of calcium oxalate urolithiasis. *J Urol* **164**, 1718-1723.
- [TSUJIHATA, 2001] Tsujihata M, Miyake O, Yoshimura K, Kakimoto K, Takahara S, Okuyama A (2001) Comparison of fibronectin content in urinary macromolecules between normal subjects and recurrent stone formers. *Eur Urol* **40**, 458-462.

- [TURNBULL, 1952] Turnbull D, Vonnegut B (1952) Nucleation catalysis. *Ind Eng Chem* **44**, 1292-1298.
- [VALHENSIECK, 1985] Vahlensieck W (1985) Influence of water quality on urolithiasis. En: Urolithiasis and related research (Schwille PO, Smith LH, Robertson WG, Vahlensieck W, eds.) p-97, Plenum, New York.
- [VERMEULEN, 1958] Vermeulen CW, Lyon ES, Miller GH (1958) Calcium phosphate solubility in urine as measured by a precipitation test: experimental urolithiasis XIII. *J Urol* **79**, 596-606.
- [WELSHMAN, 1972] Welshman S, McGeown MG (1972) A quantitative investigation of the effects on the growth of calcium oxalate crystals on potential inhibitors. *Br J Urol* **44**, 677-680.
- [WERNESSE, 1979] Werness PG, Duckworth SC, Smith LH (1979) Calcium oxalate dehydrate crystal growth. *Invest Urol* **17**, 230-233.
- [WESSLER, 1971] Wessler E (1971) The nature of the non-ultrafilterable glycosaminoglycans of normal human urine. *Biochem J* **122**, 373-384.
- [WESSON, 1998] Wesson JA, Worcester EM, Wiessner JH, Mandel NS, Kleinman JG (1998) Control of calcium oxalate crystal structure and cell adherence by urinary macromolecules. *Kidney Int* **53**, 952-957.
- [WHO, 1986] World Health Organisation (1986) Fluorides and human health. Monograph series n° 59. World Health Organisation, Geneva.
- [WICKHAM, 1993] Wickham JEA (1993) Treatment of urinary tract stones. *BMJ* **307**, 1414-1417.
- [WORCESTER, 1987] Worcester EM, Nakagawa Y, Coe FL (1987) Glycoprotein calcium oxalate crystal growth inhibitor in urine. *Min Electrolyte Metab* **13**, 267-272.
- [XIE, 2001] Xie Y, Sakatsume M, Nishi S, Narita I, Arakawa M, Gejyo F (2001) Expression, roles, receptors and regulation of osteopontin in the kidney. *Kidney Int* **60**, 1645-1657.

- [YAMATE, 1996] Yamate T, Kohri K, Umekawa T, Amasaki N, Amasaki N, Isikawa Y, Iguchi M, Kurita T (1996) The effect of osteopontin on the adhesion of calcium oxalate crystals to Madin-Darby canine kidney cells. *Eur Urol* **30**, 388-393.
- [YASUI, 1999] Yasui T, Fujita K, Hayashi Y, Ueda K, Kon S, Maeda M, Uede T, Kohri K (1999) Quantification of osteopontin in the urine of healthy and stone-forming men. *Urol Res* **27**, 225-230.
- [YOSHIOKA, 1989] Yoshioka T, Koide T, Utsunomiya M, Itatani H, Oka T, Sonoda T (1989) Possible role of Tamm-Horsfall glycoprotein in calcium oxalate crystallization. *Br J Urol* **64**, 463-467.
- [YU, 1993] Yu CC, Lee YH, Huang JK, Chen MT, Chen KK, Lin AT, Chang LS (1993) Long-term stone regrowth and recurrences rates after extracorporeal shock wave lithotripsy. *Br J Urol* **72**, 688-691.
- [ZANETTI, 1988] Zanetti G, Montanari E, Mandressi A, Guarneri A, Ceresoli A, Mazza L, Trinchieri A, Pisani E (1988) Long-term results of extracorporeal shockwave lithotripsy in renal stone treatment. *J Endourol* **2**, 163-171.
- [ZANETTI, 1997] Zanetti G, Seveso M, Montanari E, Guarneri A, Del Nero A, Nespoli R, Trinchieri A (1997) Renal stone fragments following shock wave lithotripsy. *J Urol* **158**, 352-356.

***Experimental, resultados y discusión: Anexo 1***



## Actividad de diferentes sustancias como posibles nucleantes heterogéneos

La inclusión de este anexo, en donde se recogen los resultados obtenidos en diferentes estudios con el mismo fundamento y metodología al de otros artículos publicados y presentados en esta Tesis Doctoral, permite tener una mejor comprensión del papel como nucleantes heterogéneos que pueden llegar a desempeñar diferentes sustancias al estar presentes en la orina. Debido a la ausencia de actividad como nucleantes heterogéneos de las sustancias estudiadas (albúmina, metadona, catechin, catechol y bacterias), los resultados obtenidos no se han considerado de interés para ser publicados. Sin embargo, si se ha añadido un apartado con una explicación minuciosa en esta Tesis para poner de manifiesto su estudio así como la ausencia de dicha actividad en las condiciones ensayadas.

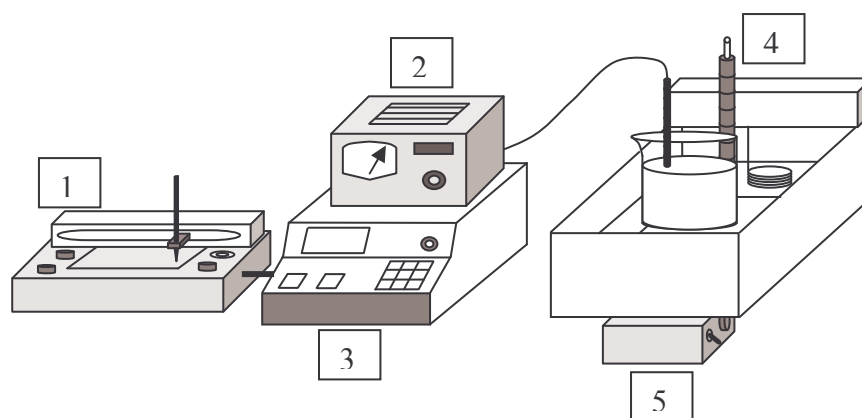
### Introducción

Uno de los factores menos estudiados y probablemente con un peso notable en el desarrollo de los cálculos renales de oxalato cálcico es la presencia de nucleantes heterogéneos, ya que la orina de todos los individuos está permanentemente sobresaturada con respecto al oxalato cálcico [FINLAYSON, 1978]. En los últimos años se ha detectado un aumento de la cantidad de cálculos renales de COM desarrollados en cavidades de baja eficacia urodinámica, siendo su formación claramente inducida por la presencia de nucleantes heterogéneos en la orina [GRASES, 2002; RAMELLO, 2000].

En los estudios *in vitro* desarrollados en esta tesis se ha podido demostrar la actividad potencial como nucleantes heterogéneos del oxalato cálcico que pueden presentar el fluoruro cálcico, la mucina y los detritus celulares. Por otra parte, también se desarrollaron una serie de estudios con el mismo procedimiento experimental utilizando otras sustancias (albúmina, metadona, polifenoles y bacterias) que podrían presentar actividad como nucleantes heterogéneos de cristales de oxalato cálcico.

### Material y métodos

Los estudios se han desarrollado usando cristalizadores tipo “batch” (figura A.1) en el que el nucleante heterogéneo se mantiene en suspensión en la orina artificial.



**Figura A.1.** Diagrama del diseño experimental usado en el sistema tipo “batch”. 1. Registro; 2. Estabilizador de corriente alterna; 3. Fotómetro equipado con una célula de medida de fibra óptica; 4. Baño termostático; 5. Agitador magnético.

Se usó orina artificial [ROBERTSON, 1986] (Tabla A.1) preparada a partir de la mezcla de volúmenes iguales de disoluciones A y B (como la usada en los diferentes estudios con los otros nucleantes), obteniendo una disolución sobresaturada con respecto al oxalato cálcico. Todas las disoluciones se prepararon en agua desionizada y bidestilada, filtrándose con filtros de 0.45  $\mu\text{m}$  antes de utilizarse. El pH de la disolución resultante se ajustó a 5.5.

**Tabla A.1.** Composición de la orina artificial.

Disolución A (mM)		Disolución B (mM)	
$\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	19.34	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	15.45
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5.93	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	15.64
$\text{NH}_4\text{Cl}$	86.73	$\text{NaCl}$	223.08
$\text{KCl}$	162.60	$\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$	0.91

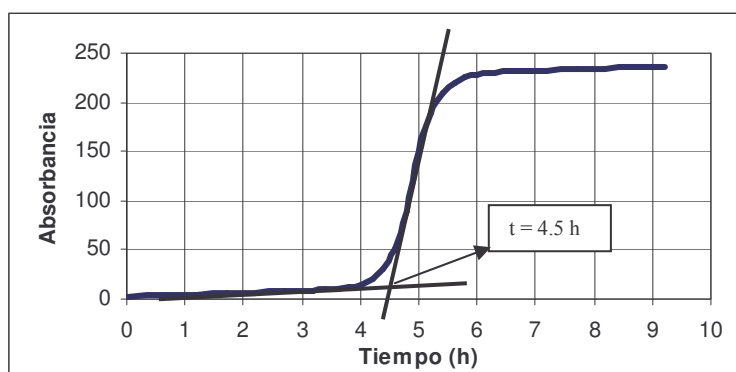
A la disolución A, se le añadió un volumen de una disolución de calcio 1 M (preparada a partir de una disolución de carbonato cálcico con ácido clorhídrico), para obtener una concentración final de calcio de 100 mg/L.

El estudio de la formación de núcleos en la orina artificial se realizó mediante medidas cinético-turbidimétricas con un fotómetro (Metrohm 662) equipado con una célula de medida de fibra óptica cuyo paso óptico es de 2 x 10 mm, usando luz monocromática (550 nm). Los procesos de cristalización se llevaron a cabo en un vaso cilíndrico de vidrio agitado magnéticamente y termostatizado (37 °C), registrando continuamente la curva absorbancia-tiempo para poder determinar el tiempo de inducción.



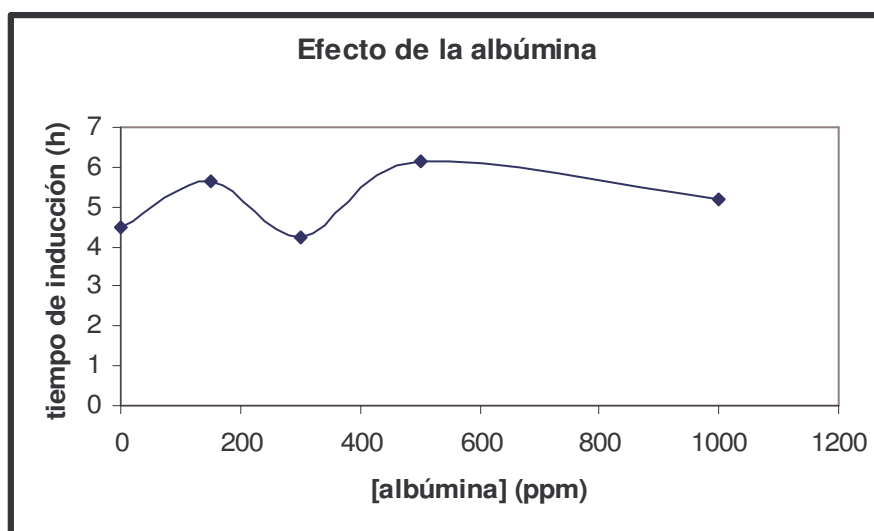
## Resultados

La determinación del tiempo de inducción de la cristalización de oxalato cálcico con el sistema “batch” se ve reflejada en la curva que se obtiene al representar la absorbancia vs tiempo (Figura A.2), donde puede apreciarse que dicho periodo de inducción en ausencia de aditivos se corresponde a 4.5 horas.



**Figura A.2.** Curva absorbancia-tiempo obtenida con el sistema “batch” mediante la que se determina el tiempo de inducción.

Utilizando la albúmina como nucleante heterogéneo se llegaron a utilizar concentraciones de hasta 1000 mg/L sin que provocara ningún avance en la precipitación del oxalato cálcico (el tiempo de inducción no disminuyó), como puede observarse en la figura A.3. No obstante, en bibliografía se han encontrado casos en que sí presenta dicho efecto [CERINI, 1999].



**Figura A.3.** Efecto de la albúmina en la nucleación heterogénea del oxalato cálcico monohidrato usando el sistema “batch”. Condiciones experimentales:  $[\text{Ca}^{2+}] = 2.5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ ,  $[\text{Oxalato}] = 4.55 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ ,  $\text{pH} = 5.50$ ,  $T = 37^\circ\text{C}$ .

Además de la albúmina, como ya se ha comentado anteriormente, se utilizaron otras sustancias: metadona, polifenoles (catechin y catechol) y bacterias. Para las tres primeras se llegaron a concentraciones de 10 mg/L, sin que ninguna de ellas presentara actividad como nucleante heterogéneo, obteniendo resultados muy similares a los obtenidos con la albúmina.

Por otra parte, se utilizaron células muertas de tres patógenos urinarios habituales, dos gram negativos (*Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*) y un gram positivo (*Enterococcus faecalis*) llegándose a concentraciones de  $10^6$  ufc/mL. A pesar de que la concentración de bacterias muertas fue en todos los casos superior a la que puede detectarse en una infección urinaria significativa, en ningún caso pudo evidenciarse una acción inductora (nucleante) del desarrollo de cristales de oxalato cálcico.

## Discusión

Se puede llegar a la conclusión de que, si bien es cierto que las bacterias tiene un papel fundamental en la litiasis infecciosa (aquellos cálculos que tienen como componentes mayoritarios estruvita e hidroxipatita), de acuerdo con nuestros resultados, su acción como nucleante heterogéneo de la litiasis oxalocálcica es prácticamente nula y además necesitaría de otros factores de riesgo litógeno.

Por otra parte, los resultados obtenidos a partir de estos estudios nos permiten demostrar que el resto de sustancias utilizadas (albúmina, metadona y polifenoles) no presentan un papel importante como nucleantes heterogéneos de los cristales de oxalato cálcico monohidrato.

## Referencias

- [CERINI, 1999] Cerini C, Geider S, Dussol B, Hennequin C, Daudon M, Veessler S, Nitsche S, Boistelle R, Berthezene P, Dupuy P, Vazi A, Berland Y, Dagorn JC, Verdier JM (1999) Nucleation of calcium oxalate crystals by albumin: involvement in the prevention of stone formation. *Kidney Int* **55**, 1776-1786.
- [FINLAYSON, 1978] Finlayson B (1978) Physicochemical aspects of urolithiasis. *Kidney Int* **13**, 344-360.

- [GRASES, 2002] Grases F, Costa-Bauzá A, Ramis M, Montesinos V, Conte A (2002) Simple classification of renal calculi closely related to their micromorphology and etiology. *Clin Chim Acta* **322**, 29-36.
- [RAMELLO, 2000] Ramello A, Vitale C, Marangella M (2000) Epidemiology of nephrolithiasis. *J Nephrol* **3**, S45-50.
- [ROBERTSON, 1986] Robertson WG, Scurr DS (1986) Modifiers of calcium oxalate crystallization found in urine. I. Studies with a continuous crystallizer using an artificial urine. *J Urol* **135**, 1322-1326.



***Experimental, resultados y discusión: Anexo 2***



# Actividad de los inhibidores como nucleantes heterogéneos

## Introducción

Al estudiar la actividad como nucleantes heterogéneos de la cristalización del oxalato cálcico llevada a cabo por diferentes compuestos, que de una manera u otra pueden formar parte de la composición de la orina, se han estudiado también varias moléculas con actividad inhibidora de dicha nucleación.

Estas moléculas (principalmente pirofosfato y fitato) presentan, a partir de una determinada concentración (diferente para cada compuesto), acción inhibidora, la cual normalmente se ve acrecentada a medida que vamos aumentando la concentración de dichos inhibidores, llegando incluso, en algunos casos, a conseguir una inhibición total.

Por ello, una estrategia que se podría plantear para evitar la acción de cualquier posible nucleante heterogéneo en la orina sería el alcanzar concentraciones muy elevadas de inhibidores en nuestro organismo.

Sin embargo, intentar solucionar un problema, aumentando de forma considerable la concentración de sustancias inhibidoras que normalmente se encuentran en la orina (caso del fitato y del pirofosfato), podría provocar la formación de núcleos por parte de cualquiera de esos dos compuestos al superarse sus valores de solubilidad, pudiendo actuar así como nucleantes heterogéneos en la formación de los cristales de oxalato cálcico (ya se han descrito algunos casos en los que el citrato actúa como nucleante heterogéneo de cálculos [*SAGER, 1955*]). Por otra parte, se ha detectado en cálculos renales cálcicos la presencia de muy pequeñas cantidades de fitato y pirofosfato [*MARCH, 2001a; MARCH, 2001b*]. Sin embargo en estos casos, en ninguna ocasión actúan como nucleantes, sino que forman parte de la estructura cristalina del cálculo. Además, se han observado casos en que elevadas concentraciones de pirofosfato en fluidos biológicos pueden provocar calcificaciones patológicas [*RYAN, 1997*].

Por este motivo se planteó la investigación de la posible acción como nucleante heterogéneo de los propios inhibidores de la nucleación heterogénea, comprobando si la presencia de elevadas concentraciones de inhibidores podría provocar su propia nucleación.

## Material y métodos

Se usó orina artificial [ROBERTSON, 1986] (Tabla A.1) preparada a partir de la mezcla de volúmenes iguales de disoluciones A y B (como la usada en los diferentes estudios con los otros nucleantes). Todas las disoluciones se prepararon en agua desionizada y bidestilada, y se filtraron con filtros de 0.45  $\mu\text{m}$  antes de utilizarse.

**Tabla A.1.** Composición de la orina artificial.

Disolución A (mM)		Disolución B (mM)	
$\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	19.34	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	15.45
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5.93	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	15.64
$\text{NH}_4\text{Cl}$	86.73	$\text{NaCl}$	223.08
$\text{KCl}$	162.60	$\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$	0.91

A la disolución A, se le añadieron diferentes volúmenes de una disolución de calcio 1 M (preparada a partir de una disolución de carbonato cálcico con ácido clorhídrico), para obtener una concentración final de calcio comprendida entre 100 y 500 ppm (mg/L), ya que en dicho intervalo se encuentran los valores normalmente encontrados en orina. De esta manera, una concentración superior a 170 ppm es considerada como hipercalciuria, siendo casos excepcionales los superiores a 300 ppm.

El estudio de la formación de núcleos en la orina artificial se realizó mediante medidas cinético-turbidimétricas con un fotómetro (Metrohm 662) equipado con una célula de medida de fibra óptica cuyo paso óptico es de 2 x 10 mm, y usando luz monocromática (550 nm).

## Resultados

Se estudió el efecto de la presencia de fitato y pirofosfato a diferentes valores de pH (5, 5.5, 5.75 y 6) y a diferentes concentraciones de calcio (100, 150, 200, 300, 400 y 500 ppm). A continuación pueden verse los resultados obtenidos a las concentraciones, en mg/L, de fitato (A) y pirofosfato (B) a las que se detecta la formación de cristales (Tabla A.2 y Tabla A.3). La lectura de absorbancia se realizó 24 horas después de la mezcla de disoluciones que formaban la orina artificial utilizada.



**Tabla A.2.** Concentraciones de fitato (en mg/L) a las que se detecta la formación de cristales después de 24 horas.

#### FITATO

	100 ppm Ca	150 ppm Ca	200 ppm Ca	300 ppm Ca	400 ppm Ca	500 ppm Ca
pH = 5	1000	500	1000	500	1000	1000
pH = 5'5	500	250	500	250	100	50
pH = 5'75	500	500	250	50	20	20
pH = 6	250	100	50	20	10	5

**Tabla A.3.** Concentraciones de pirofosfato (en mg/L) a las que se detecta la formación de cristales después de 24 horas.

#### PIROFOSFATO

	100 ppm Ca	150 ppm Ca	200 ppm Ca	300 ppm Ca	400 ppm Ca	500 ppm Ca
pH = 5	> 6000	> 6000	> 6000	3000	3000	3000
pH = 5'5	1000	1000	500	500	100	100
pH = 5'75	250	100	100	100	50	50
pH = 6	250	100	100	50	50	50

## Discusión

A partir de los resultados obtenidos puede observarse que en orina artificial, a valores bajos de pH y bajas concentraciones de calcio, los niveles de fitato y pirofosfato presentes en la orina pueden llegar a elevados valores sin que se detecte la formación de cristales. Así, un individuo sano que presentara una concentración de 150 ppm de calcio y pH 5.5, requeriría una concentración de 250 ppm de fitato o 1000 ppm de pirofosfato para que pudieran actuar como promotores de la nucleación heterogénea.

Vale la pena señalar que en la serie de estudios realizados *in vitro* para los diferentes nucleantes propuestos, las concentraciones máximas utilizadas de fitato y pirofosfato en la orina sintética era de 5 y de 10 ppm respectivamente, concentraciones con las cuales se obtenían niveles de inhibición muy importantes.

De hecho, los valores de concentraciones encontradas normalmente en orina tanto de fitato como de pirofosfato no sobrepasan habitualmente las 4 y 7 ppm, respectivamente [GRASES, 2000; SIMONET, 2003]. De esta manera, solamente en el caso en que un individuo tuviera una elevada hipercalciuria (superior a las 400 ppm) unida a un valor de pH superior a 6 y junto a valores muy altos de fitato y/o pirofosfato (difícilmente alcanzables en humanos) podrían sufrir los efectos como nucleantes heterogéneos de dichos inhibidores.

## Referencias

- [GRASES, 2000] Grases F, March JG, Prieto RM, Simonet BM, Costa-Bauzá A, García-Raja A, Conte A (2000) Urinary phytate in calcium oxalate stone formers and healthy people. Dietary effects on phytate excretion. *Scand J Urol Nephrol* **34**, 162-164.
- [MARCH, 2001a] March JG, Simonet BM, Grases F (2001) Determination of pyrophosphate in renal calculi and urine by means of an enzymatic method. *Clin Chim Acta* **314**, 187-194.
- [MARCH, 2001b] March JG, Simonet BM, Grases F (2001) Determination of phytic acid by gas chromatography-mass spectrometry: application to biological samples. *J Chromatogr B* **757**, 247-255.
- [ROBERTSON, 1986] Robertson WG, Scurr DS (1986) Modifiers of calcium oxalate crystallization found in urine. I. Studies with a continuous crystallizer using an artificial urine. *J Urol* **135**, 1322-1326.
- [RYAN, 1997] Ryan LM, McCarty DJ (1997) En: Arthritis and allied conditions: a textbook of rheumatology (Koopman W ed) Williams and Wilkins, Baltimore.
- [SAGER, 1955] Sager RH, Spargo B (1955) The effects of a low phosphorus ration on calcium metabolism in the rat with the production of calcium citrate urinary calculi. *Metabolism* **4**, 519-530.
- [SIMONET, 2003] Simonet BM, Grases F, March JG (2003) Enzymatic determination of pyrophosphate in urine by flow methods. *Anal Sci* **19**, 1029-1032.

# *Capítulo 3*

*Absorción del fitato a través de la piel*



## ***Introducción***



# INTRODUCCIÓN

## 1. La Piel

La piel es uno de los órganos más extensos del cuerpo (sólo superado por el intestino y por el epitelio alveolar pulmonar). Presenta un área de 1.5-2 m<sup>2</sup> y pesa casi 4 kg. La piel está formada por tejido epitelial y constituye la capa más externa del cuerpo, al cual recubre en toda su superficie. Está clasificada como una membrana, la *membrana cutánea*, que envuelve las estructuras orgánicas (tejidos y órganos) y las sustancias vitales (sobretudo, líquidos).

### 1.1. Estructura de la piel

La piel o integumento es un órgano estratificado con tres capas de tejido distinto (Figura 3.1): la epidermis, la dermis y el tejido adiposo subcutáneo (o hipodermis) [KRSTIC, 1989]. Las dos primeras capas forman el cutis, mientras que la tercera constituye lo que se llama subcutis. El conjunto de las 3 capas forma una estructura muy resistente: un área de 1 cm<sup>2</sup> de piel puede soportar una tracción de 12 kg. La piel no es uniforme en toda la superficie corporal.

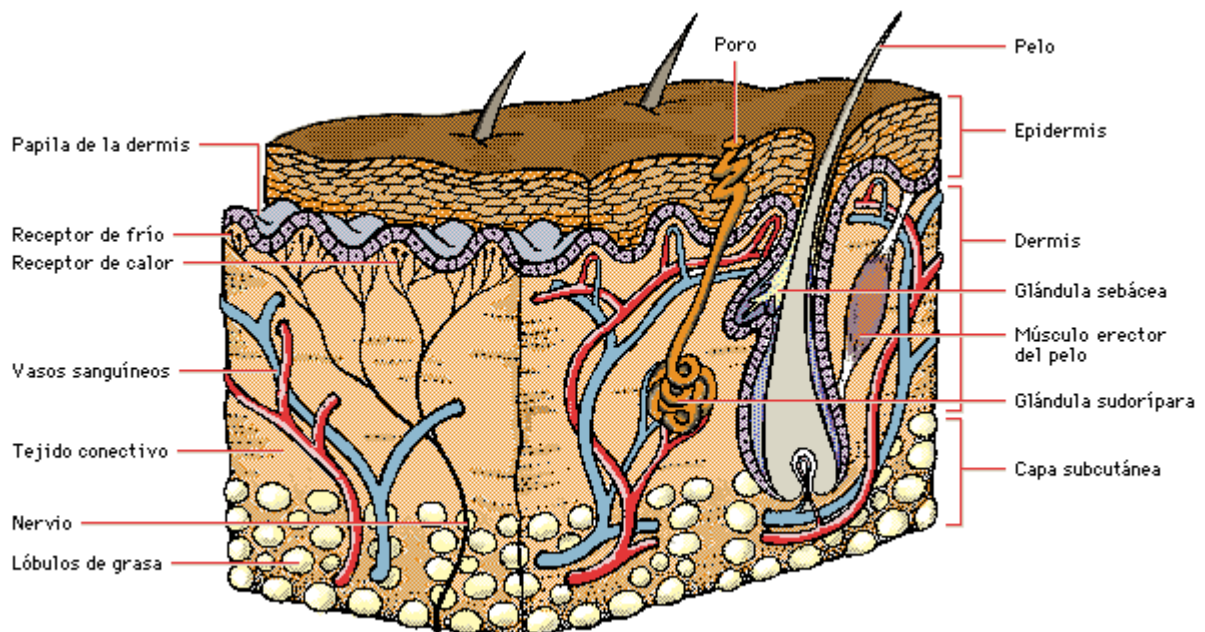


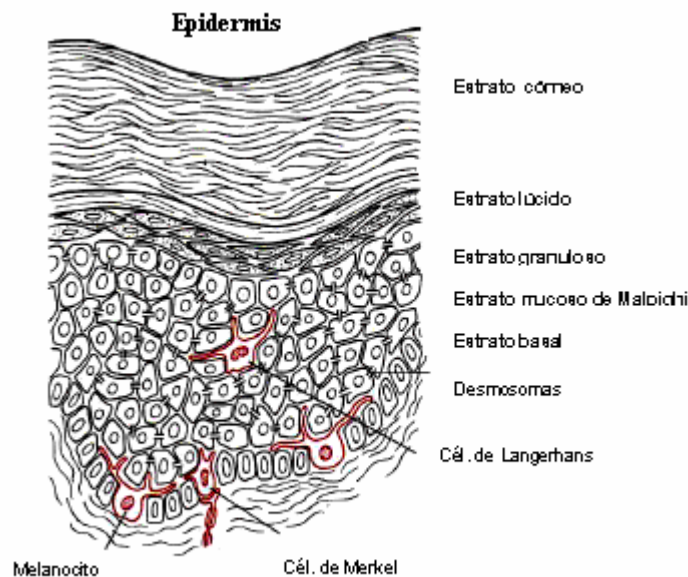
Figura 3.1.- Estructura de la piel.

A continuación se comentarán los aspectos más relevantes de cada capa cutánea:

### **1.1.1. Epidermis**

La epidermis tiene un espesor que varía según el lugar estudiado, llegando a los 1.5 mm en las palmas de las manos y en las plantas de los pies. Se trata de una capa superficial de células y es totalmente avascular (no tiene ni vasos sanguíneos ni linfáticos). Se nutre de la capa inferior, la dermis, la cual sí está irrigada por vasos sanguíneos. A esta capa llegan terminaciones nerviosas aferentes, que la hacen sensible al tacto, al dolor y a la temperatura. La función fundamental de la epidermis es la síntesis de queratina, la cual es elástica y resistente, ideal para sus funciones de protección, existiendo dos tipos: la blanda (epidérmica) y la dura (pelo y uñas).

Presenta 4 tipos celulares: los melanocitos, los queratinoblastos/queratinocitos, las células de Langerhans y las células de Merkel [LEONHARD, 1991]. La epidermis, que se encuentra en un proceso constante de queratinización, está constituida por 5 capas celulares diferentes, siendo en las dos inferiores donde tiene lugar la regeneración. Desde ese lugar las células migran hacia la superficie de la piel llegando a queratinizarse del todo durante la migración. En la Figura 3.2 pueden observarse las capas de la epidermis, desde el nivel más profundo al más superficial, que son las siguientes:



**Figura 3.2.-** Estructura de la epidermis.



- La capa basal (la más interna) es la regenerativa, formada por células vivas (queratinoblastos, que son poligonales) que se reproducen continuamente por mitosis, desplazando, estas células jóvenes formadas, a las viejas de las capas superiores. En esta capa es donde se encuentran los melanocitos, que son los responsables de la producción del pigmento (la melanina) que da la coloración a la piel, típica de cada raza. También se encuentran las células de Langerhans con funciones defensivas (son el principal efector de las reacciones inmunes epidérmicas) y células sensoriales de Merkel, que permiten la percepción por tacto prolongado.
- Estrato espinoso o de Malpighi: situado por encima de la capa basal, está constituido por células que representan otro estadio de evolución de las células basales (los queratinocitos, que son más planos que los queratinoblastos). Se unen entre sí y con las células de la capa basal formando una armadura sólida, dándole estabilidad frente a la distorsión mecánica.
- Estrato granuloso: formado por elementos celulares planos que contienen gránulos de queratohialina (sustancia característica de esta capa). Estas células no se pueden dividir, ya que están dedicadas de forma exclusiva a la síntesis de queratina.
- El estrato lúcido o pre-córneo: consiste en una capa celular sin capacidad de división (no tienen núcleo) que proporciona elasticidad a zonas sometidas a esfuerzos mecánicos (planta de la mano, del pie) teniendo en estas zonas su máximo grosor.
- Estrato córneo, que es el más superficial, formado por capas de células epiteliales (la mayor parte de ellas células muertas), superficiales y queratinizadas entremezcladas en múltiples capas de células lipídicas [SWEENEY, 1970] que se van desprendiendo por descamación y renovando de forma constante, fenómeno que en condiciones normales es imperceptible. Esta capa aparece en toda la piel excepto en las mucosas (labios, boca, etc.). También regula la transferencia de sustancias químicas y agentes infecciosos hacia la dermis, y previene la pérdida rápida de agua de la epidermis hacia el medio. La vitamina A regula la formación de esta capa; su carencia conduce a una proliferación excesiva (hiperqueratosis).

La estructura que separa a la dermis de la epidermis se denomina membrana basal, la cual controla el intercambio celular y molecular entre los dos tejidos e interviene en el proceso de curación de las heridas (Figura 3.3). Los tumores malignos de la piel rompen la membrana basal (invasión tumoral), iniciando así la expansión tumoral. Tiene 4 zonas principales: la membrana plasmática de la célula basal, la lámina lúcida, la lámina densa y la zona fibrosa. Sus funciones son: soporte mecánico, barrera de regulación de la permeabilidad, fijación de las células basales al tejido conectivo, rol en el desarrollo y morfogénesis de las células epiteliales.

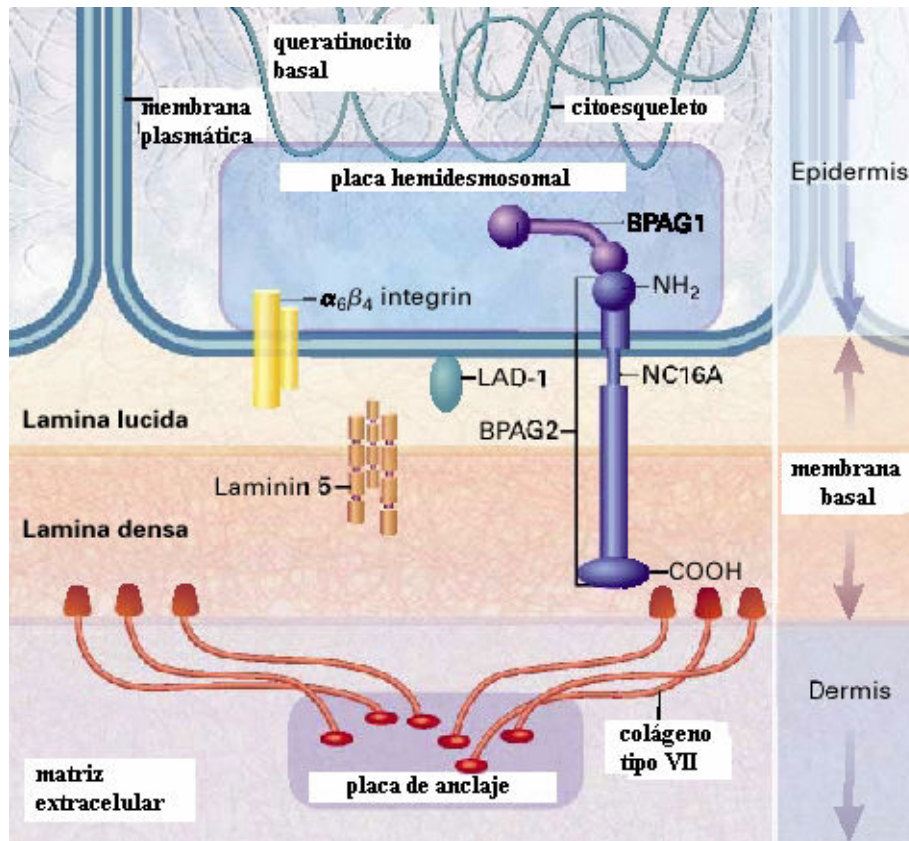


Figura 3.3.- Estructura de la membrana basal.

### 1.1.2. Dermis o corion

La dermis es una capa que se encuentra por debajo de la epidermis formada por tejido conjuntivo fibroso, siendo mucho más gruesa (llega a los 3 mm en la planta de los pies). La dermis forma la mayor parte de la piel y es la que constituye el verdadero soporte de este órgano [THIBODEAU, 2000]. Lleva a cabo también una función protectora (representa la segunda línea de defensa frente a los traumatismos) siendo esencial en el proceso de cicatrización. Constituye

un gran depósito potencial de agua, sangre y electrolitos. La dermis contiene los apéndices o anexos cutáneos que son de dos tipos:

#### 1.1.2.1. Glandulares

Glándulas sudoríparas: producen el sudor o transpiración y llegan hasta la epidermis. Son pequeñas, enrolladas y tubulares (Figura 3.1) desembocando sus conductos en la superficie del cuerpo. Producen una secreción ácida (ácido láctico) que limita el crecimiento bacteriano en la piel. Regulan el equilibrio térmico del organismo y mantienen el pH de la superficie cutánea.

Glándulas sebáceas: secretan grasa. Son formaciones anexas a un folículo piloso, al cual le desembocan su secreción, el sebo, que tiene varias funciones: lubricante, emoliente, fungistática y bactericida.

#### 1.1.2.2. Cornis

Pelos: son estructuras constituidas por células queratinizadas, fuertemente unidas entre sí, que crecen en invaginaciones epidérmicas que se implantan profundamente en la dermis. Los pelos, juntamente con las glándulas sebáceas situadas a sus lados constituyen la unidad pilo-sebácea (característica de los mamíferos). También encontramos las raíces de los pelos con sus músculos lisos (el horripilador o erector del pelo).

Uñas: constituyen formaciones epidérmicas córneas situadas en la cara dorsal de la tercera falange de los dedos. Protegen las extremidades digitales y aumentan la capacidad de sujeción.

También encontramos abundantes capilares sanguíneos y linfáticos, y terminaciones nerviosas sensitivas que recogen diversas sensaciones: calor, frío, dolor,... Encontramos diferentes tipos de fibras que dan lugar a la flexibilidad, elasticidad, suavidad y resistencia característica que presenta. Éstas son:

- Fibras de colágeno: son el principal componente de la dermis.

- Fibras elásticas: son las responsables de la elasticidad de la piel. Son más escasas.
- Fibras de reticulina: son mucho más escasas. Se disponen alrededor de los anexos (pelos, uñas, glándulas) y de los vasos sanguíneos.

Según la disposición de estas fibras, la dermis está dividida en tres zonas que, de nivel más superficial a más profundo, son: dermis papilar, dermis reticular y dermis profunda. Las células que forman principalmente la dermis se denominan fibroblastos, que son las encargadas de producir las fibras de colágeno y elásticas. También se encuentran presentes células del sistema inmunológico: linfocitos, macrófagos, eosinófilos y mastocitos. Estos últimos intervienen en reacciones alérgicas e inflamatorias.

Entre la dermis y el cutis no hay una delimitación pronunciada.

### **1.1.3. Tejido subcutáneo, subcutis o hipodermis**

Por debajo de la dermis encontramos el tejido subcutáneo que se compone de tejido conjuntivo laxo y adiposo [LÓPEZ, 1986]. En él se almacena las reservas de grasa del organismo, que constituyen un amortiguador contra los golpes (por ejemplo de las prominencias óseas en las nalgas) y un aislante térmico del cuerpo. El espesor de esta capa, que varía enormemente de una persona a otra, depende del tamaño y el número de células de grasa.

Este tejido contiene nervios cutáneos, vasos sanguíneos, vasos linfáticos y glándulas sudoríparas. En toda la extensión del tejido subcutáneo tenemos los ligamentos de la piel, que son unas pequeñas bandas fibrosas y abundantes, y su función es unir la superficie profunda de la dermis con la fascia profunda. Son precisamente estos ligamentos quienes permiten mover la piel sobre las estructuras que se encuentran situadas por debajo de ella. Se encuentran los receptores táctiles (Meissner), del frío (Krause), del calor (Ruffini) y de la presión y vibración (Vater-Pacini).

Por debajo del tejido subcutáneo se encuentra la fascia profunda; se trata de una capa densa de tejido conjuntivo que rodea las capas inferiores del músculo esquelético y que ya no se considera parte de la piel. Dentro de la estructura de la fascia profunda se crean *compartimientos fasciales*, que pueden contener o dirigir, por ejemplo, la propagación de una infección o tumor.

## 1.2. Funciones de la piel

La piel ofrece:

1. Protección al organismo frente al medio exterior: traumatismos mecánicos, agentes físicos, agentes químicos, invasiones de bacterias y otros agentes infecciosos, cambios bruscos de temperatura del medio exterior y exposición prolongada a las radiaciones solares ultravioletas.
2. Regulación térmica a través de las glándulas sudoríparas (evaporación del sudor), de los vasos sanguíneos (mediante fenómenos de vasodilatación/vasoconstricción) y por aislamiento proporcionado por grasa y pelo.
3. Sensibilidad a través de los nervios superficiales y sus terminaciones sensitivas.
4. Función excretora complementaria a los riñones: el sudor contiene una diversidad de sustancias (sales inorgánicas, urea, ácido úrico, amoníaco, creatinina) que lo hacen parecido a la orina.
5. Función secretora: la grasa es secretada por glándulas específicas hacia la superficie. La grasa impide la sequedad y las fisuras de la piel, protege contra la excesiva radiación ultravioleta y ayuda a mantener dócil el cabello.
6. Función nutritiva: en la piel se forma la vitamina D por acción de los rayos solares.
7. Papel importante en el intercambio de gases.

## 2. Absorción tópica

La accesibilidad y la posibilidad de mantener intactas las preparaciones que se aplican sobre la piel durante un periodo prolongado, ha dado como resultado el creciente uso de la vía tópica como ruta de administración de diferentes sustancias. Cuando se libera un principio activo pueden ocurrir diferentes fenómenos; así por ejemplo, si la molécula se adhiere a la superficie de la piel o de una mucosa por uniones iónicas, por puentes de hidrógeno o por fuerzas de Van der Waals, el fenómeno se denomina adsorción. Si por el contrario, llega a las

capas internas de la piel pero no llega a los capilares, el fenómeno se conoce como penetración. Sólo cuando el principio activo atraviesa la pared de los capilares y llega al torrente sanguíneo podemos hablar de absorción. Así, para que una sustancia pueda llegar al torrente sanguíneo por vía tópica primero tiene que difundirse a través de la capa córnea y atravesar las otras capas de la epidermis. Después llega a la dermis donde puede contactar con el sistema vascular y pasar finalmente a la sangre [MOORE, 2002].

Existen diferentes mecanismos de paso de membranas biológicas, que por orden de importancia son: difusión pasiva, el transporte convectivo, el transporte activo, el transporte facilitado, el transporte por par iónico y la endocitosis o pinocitosis (transporte de partículas). Todos estos son mecanismos generales que se pueden producir en la absorción de sustancias a través de las diferentes vías de administración. Las más usadas son la oral, peroral, intramuscular, intradérmica, rectal y tópica (o externa).

Si comparamos la magnitud de la absorción por las diferentes vías de administración, vemos que la absorción por vía tópica se encuentra limitada debido a la estructura anatómica de la piel (de notable complejidad), que a diferencia del intestino, es mucho más gruesa (tiene varias capas) y los vasos sanguíneos no irrigan la piel en la epidermis, la capa más externa de la piel. La capa córnea (el estrato más superficial de la piel) es la principal barrera que se opone al transporte a través de la piel. En esta capa se forma un complejo queratin-fosfolipídico que limita el paso de sustancias químicas y posee una resistencia eléctrica elevada.

La piel es una barrera de entrada de sustancias y agua muy poderosa. No obstante, las sustancias que tienen simultáneamente naturaleza hidrófila y lipófila (sin ionizar) se absorben más fácilmente por la piel que las que son sólo hidrosolubles o sólo liposolubles, o las que se encuentran ionizadas. Además, la vía tópica es la única vía donde la sustancia a absorber y la matriz que la acompaña tienen la misma importancia.

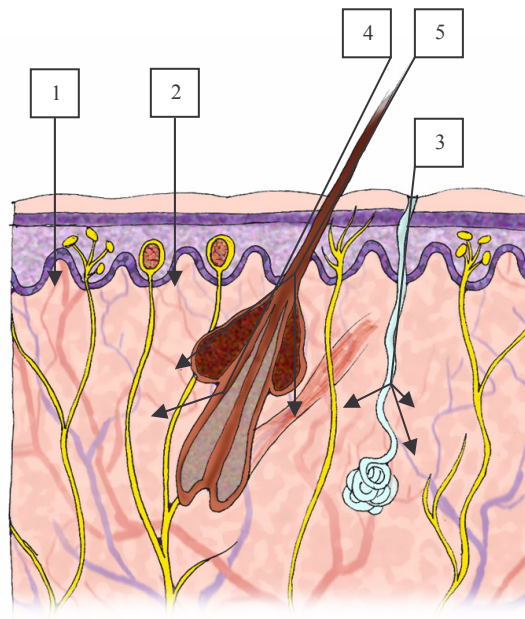
En la piel, sabemos que la absorción se da por difusión pasiva, ya que no posee ningún mecanismo de transporte activo (receptores específicos para la sustancia a absorber). Este mecanismo se caracteriza por realizarse a través de una membrana semipermeable y se rige por las leyes de difusión de Fick, que establecen que la difusión es proporcional a la diferencia de concentraciones a cada lado de la membrana interpuesta, siendo la constante de proporcionalidad en este caso la constante de permeabilidad de la membrana. El principio activo tiene que estar en disolución acuosa en el lugar de la absorción.

En la piel, la difusión pasiva se produce por diferentes vías (Figura 3.4), que son principalmente tres [HADGRAFT, 2001; POTTS, 1992; SAUNAL, 1988]:

- Transcelular (1): es la más importante, especialmente para sustancias hidrofóbicas. Las sustancias que se absorben lo hacen atravesando las células epiteliales de la capa córnea de la epidermis, disolviéndose en su membrana de acuerdo con su liposolubilidad y coeficiente de partición.

- Intercelular (2): la sustancia entra a través de las uniones e intersticios que hay entre las células epiteliales.

- A través de los anexos: las sustancias se absorben a través de la pared de las glándulas sudoríparas (3), los folículos pilosos (4) y las glándulas sebáceas (5). Esta vía es la que se da en menor porcentaje.



**Figura 3.4.-** Vías de penetración a través de la piel.

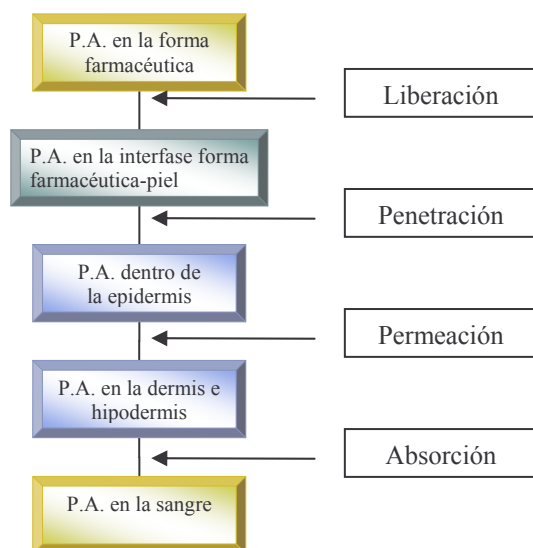
En la Tabla 3.1 se observan las difusividades para el agua y volúmenes relativos de algunas vías de penetración; como podemos ver, aunque la vía transcelular no presenta los valores más altos de constante de difusividad, su volumen fraccional provoca que sea una vía de entrada muy importante [SCHEUPLEIN, 1971]. Por otra parte, es evidente que la difusión a través

de los anexos es más rápida (presentan constantes de difusión más altas) que la vía transdérmica, pero su abundancia es muy inferior, suponiendo un efecto poco significativo.

**Tabla 3.1.-** Importancia relativa de las vías de penetración sobre la permeabilidad del agua a través de la piel.

Vía de penetración	Volumen fraccional	Constante de difusión
Transcelular	0.999	$5-10 \cdot 10^{-10}$
Intercelular	-	$1-10 \cdot 10^{-11}$
Folículo piloso	$1-2 \cdot 10^{-3}$	$5-20 \cdot 10^{-8}$
<b>Glándula sudorípara</b>	$3-5 \cdot 10^{-4}$	$1-20 \cdot 10^{-6}$

Cuando se administra un principio activo (PA) por vía tópica o transepidermal (ya sea crema, pomada, gel o emulsión líquida) el transporte se lleva a cabo mediante una serie de etapas en las que se sigue la secuencia de liberación, penetración, permeación y absorción, como podemos ver en la Figura 3.5.



**Figura 3.5.-** Etapas de la absorción transepidermal.



Hoy en día ya se han descrito varias aplicaciones de uso tópico del fitato, molécula para la cual se ha conseguido su absorción tópica, llegada a la sangre y eliminación a través de la orina [GRASES, 2005a]. Entre las aplicaciones dérmicas del fitato, la mayor parte de ellas, hacen referencia a su acción antienvjecimiento prematuro o como agente despigmentante [UEZEN, 1998].

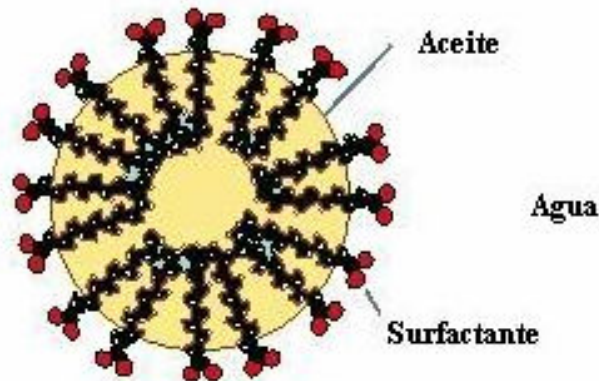
Otros estudios parecen demostrar cierta capacidad del fitato para inhibir el cáncer de piel [GUPTA, 2003; ISHIKAWA, 1999] y también para evitar calcificaciones subepiteliales [GRASES, 2005b].

A pesar de estos hechos, se sabe aún muy poco de la absorción de fitato a través de la piel y del tracto gastrointestinal. Mediante administración tópica se observó un nivel urinario máximo de fitato en ratas diez veces mayor que por vía oral catorce días después del inicio del tratamiento [GRASES, 2005a]. Una posible explicación a este hecho sería considerar que en el tracto gastrointestinal el fitato puede formar especies insolubles con proteínas y cationes divalentes y trivalentes que provienen de la dieta, con lo que no podría ser absorbido. La formación de estas especies insolubles no tiene lugar si la absorción del fitato se hace por vía tópica. No obstante, todavía quedan muchos aspectos a clarificar sobre la absorción de fitato, uno de los cuales es el efecto que presenta la matriz vehicular donde se encuentra el fitato en su absorción.

Desde el punto de vista farmacotécnico, las formas de administración tópica son las más difíciles de formular ya que constituyen el único grupo donde el principio activo y la base o matriz tienen la misma importancia. Este hecho se refleja en la diferencia de la actividad terapéutica de preparados que contienen un mismo principio activo (en la misma forma química), pero que están formuladas en matrices de diferente composición. Por esta razón, se ha estudiado la absorción tópica del fitato en animales de experimentación en formato crema O/W (aceite en agua) con un porcentaje de agua del 70 %, y un gel hidratante fácilmente extensible con un porcentaje del 90 % de agua. Además, con cada una de estas bases, hemos experimentado con dos concentraciones diferentes de fitato (en la misma forma química), para ver la influencia que tiene la matriz en nuestro caso.

Las cremas son preparaciones homogéneas y semisólidas consistentes en sistemas de emulsión opacos. Su consistencia y sus propiedades reológicas (viscosidad, plasticidad y elasticidad) dependen del tipo de emulsión, bien sea W/O (hidrófobas) o O/W (hidrófilas), y de la naturaleza de los sólidos que la forman. Una emulsión es una mezcla de aceites, grasas y ceras con agua, de tal manera que, finalmente, se obtiene un sistema estable gracias a la acción

de un emulsificante y/o surfactante. En nuestro caso, la crema es O/W, ya que la fase oleosa se encuentra en menor proporción. En este tipo de cremas el aceite se dispersa en pequeñas gotículas (formando micelas) dentro del agua (la cual tiene disuelta el fitato) que forma la fase continua, mientras que un surfactante se encarga de rodear las gotículas de aceite formando una emulsión (Figura 3.6); también es posible encontrar pequeñas gotículas de agua en las micelas formadas.

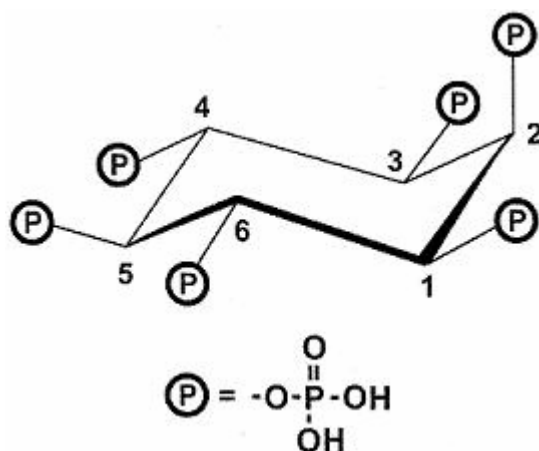


**Figura 3.6.-** Formación de una emulsión óleo-acuosa.

Los geles son preparaciones homogéneas claras y semisólidas, a veces llamadas jaleas, que poseen una fase líquida dentro de una matriz polimérica tridimensional con unión cruzada física o a veces química por medio de agentes gelificantes apropiados. Los geles a menudo presentan una liberación más rápida del principio activo, independientemente de la hidrosolubilidad del mismo en comparación con cremas y pomadas.

### 3. El fitato

En el capítulo 2 de esta tesis ya se ha comentado el efecto inhibitor de la cristalización que presenta el fitato. Sin embargo, quedan otros muchos aspectos de esta molécula a los cuales no se les ha hecho referencia. El fitato (*myo*-inositol 1,2,3,4,5,6-hexakis(dihidrogenfosfato)), ácido fítico o  $\text{InsP}_6$ , fue descubierto en el año 1872 por Pfeffer en semillas de vegetales, donde se encontraba en forma de sal cálcico-magnésica (la fitina). No obstante, no fue hasta 1914 cuando Anderson [ANDERSON, 1914] estableció la estructura correcta del fitato [ERDMAN, 1979; HARLAND, 1986; THOMPSON, 1987] (Figura 3.7).



**Figura 3.7.-** Estructura del *myo*-inositol 1,2,3,4,5,6-hexakis(dihidrogenfosfato).

#### 3.1. Localización del fitato

El ácido fítico, representado como  $\text{InsP}_6$ , es el inositol fosfato más abundante de la naturaleza. El fitato se encuentra en cantidades importantes en los cereales, en las semillas y en los frutos secos [HARLAND, 1987], siendo en el germen de las semillas en donde se encuentra en mayor cantidad; encontramos menos en el endosperma de las semillas y mínimamente en las raíces [CAMIRE, 1982; RAVINDRAN, 1994]. El contenido en fitato de diferentes semillas comprende valores de entre 0.4 – 6.4 % [OGAWA, 1975; REDDY, 2002], como puede verse en la Tabla 3.2, a las que sirve como fuente de fósforo durante la germinación [GIBSON, 1990; RABOY, 1990].

**Tabla 3.2.** Contenido en fitato en % respecto al peso seco de diferentes semillas.

Vegetal	Fitato (%)
Maíz	2-6.4
Trigo	1.1-4.8
Judía	2.5
Cacahuete	1.9
Arroz	2.2
Girasol	1.9
Soja	0.1-1.8
Cebada	1
Guisante	0.9
Avena	0.8

## 3.2. Absorción, distribución, excreción y toxicidad del fitato

### 3.2.1. Estudios con animales de experimentación

Se ha demostrado que los niveles de fitato en el organismo se encuentran directamente relacionados con su ingesta oral (la síntesis endógena *de novo* por parte del organismo es prácticamente nula) [GRASES, 2000a; GRASES, 2001a], lográndose niveles plasmáticos máximos tanto con una dieta que contiene un 1 % en forma de sal sódica, como con una que contiene un 0.12 % en forma de sal cálcico-magnésica (fitina) procedente de germen de garrofin [GRASES, 2001b]. Así, un consumo de fitato de 20.9 mg por kg de peso corporal y por día provoca la excreción urinaria máxima, que corresponde a un 2 % de la dosis ingerida. Aumentos posteriores de la cantidad de fitato suministrada no originan nuevos incrementos en la excreción urinaria. Por otra parte, la concentración urinaria de fitato disminuye hasta valores no detectables (a los 22 días) cuando se elimina completamente de la dieta [GRASES, 2000a; GRASES, 2001a].

Una vez absorbido, el fitato se distribuye desde la sangre hacia los órganos y tejidos, donde la cantidad presente depende claramente de su aporte exógeno. Este hecho lo confirman estudios de su presencia en orina, plasma, riñón, hígado, hueso y cerebro de animales de experimentación, en los que se observa que la concentración plasmática es 10 veces inferior a la urinaria y 100 veces inferior a la concentración en el cerebro. Al suprimir el fitato de la dieta, todos los niveles bajan de forma drástica, atribuyéndolo a la disminución del fitato extracelular [GRASES, 2001a; GRASES, 2001c].

Recientemente se ha conseguido la absorción del fitato por vía tópica mediante el uso de una crema, siendo sus niveles urinarios unas 10 veces superiores a los que se consiguen a través de la dieta y existiendo una relación entre la concentración excretada y la concentración de fitato utilizada en la crema. Se ha observado que el fitato sódico al 2 % (gracias a su mayor solubilidad) se absorbe en mayor cantidad que la sal cálcico-magnésica (fitina) a la misma concentración. No obstante, también existe un máximo de absorción para las dos sales por encima del cual no se excreta más fitato a través de la orina, obteniéndose unos valores urinarios de unos 45 y 15 mg/L respectivamente [GRASES, 2005a].

Una ventaja que presenta el fitato es su casi nula toxicidad, como se demuestra en estudios de toxicidad aguda del ácido fítico y del fitato sódico administrado por vía oral en ratas y ratones, en los que se obtuvo una DL50 situada entre 400 y 2.750 mg/kg [FUJITANI, 1987; ISHIKAWA, 1987]. Estudios con animales de experimentación han demostrado que el fitato es muy seguro y que no presenta efectos tóxicos, incluso cuando es administrado durante largos periodos de tiempo y/o elevadas dosis [ULLAH, 1990].

#### **3.2.2. Estudios con humanos**

De los estudios realizados en humanos se obtienen conclusiones paralelas a las obtenidas con ratas. Así, el fitato se encuentra presente en la orina humana a concentraciones que oscilan entre los 0.5 y 6 mg/L, siendo las concentraciones encontradas en litiásicos de oxalato cálcico significativamente menores a las encontradas en el grupo de individuos sanos [GRASES, 1996; GRASES, 1998; GRASES, 2000b; GRASES, 2001d].

Cuando se elimina completamente el fitato de la dieta durante 36 horas, su concentración urinaria disminuye a la mitad [GRASES, 2000b], mientras que si el periodo es de dos semanas la concentración se reduce en un 90 % en orina y en un 74 % en plasma [GRASES, 2001d]. Por otra parte, al retomar la dieta normal o al consumir algún complemento dietético se restablece la concentración basal de fitato, encontrándose el máximo de absorción a las 4 horas de su ingesta. Análogamente a los animales de experimentación, existe una cantidad ingerida óptima de fitato, cuya absorción no depende de la sal utilizada (fitina o fitato sódico), por encima de la cual no se absorbe más. Los niveles urinarios y plasmáticos de fitato dependen básicamente de la dieta (el organismo no puede sintetizarlo) [GRASES, 2001d].

Además, los valores de concentración plasmática del fitato se encuentran directamente relacionados con los de su excreción urinaria (orina acumulada durante las dos horas previas a la recolección de la muestra sanguínea), demostrando así que la concentración de fitato urinario se puede utilizar como un marcador de la situación en que se encuentra el fitato en el organismo [GRASES, 2001d].

Por otra parte, se ha demostrado que la absorción por vía oral de fitato no depende de las condiciones del estómago (vacío, lleno o basificado y lleno) y no tiene lugar solamente a nivel estomacal (como se había creído hasta ahora), sino que también se da durante el tránsito intestinal, independientemente de la existencia o no de un transportador específico [GRASES, 2006].

### 3.3. Fitato y biodisponibilidad mineral

Desde su descubrimiento, los primeros estudios nutricionales sobre el ácido fítico [HARRISON, 1939; MELLANBY, 1925] parecían demostrar que podía llegar a provocar raquitismo en perros. A partir de este estudio, surgieron otros muchos en los cuales se le atribuía propiedades de antinutriente [DAVIES, 1979; FORBES, 1979; FORBES, 1984; HURRELL, 1992; KHOKHAR, 1994; MANARY, 2000; PALLAUF, 1999; REDDY, 1982; ZHOU, 1992], hecho que hizo aconsejable eliminarlo de la dieta para evitar problemas de biodisponibilidad de determinados metales [HARLAND, 1987; MAGA, 1982; RICKARD, 1997]. Se basaban en que era una molécula con seis grupos fosfato (tenía mucha carga) y que, además, presentaba mucha afinidad para cationes divalentes y trivalentes, con los que podía formar especies insolubles a nivel intestinal, evitando su absorción y reduciendo la biodisponibilidad de estos elementos: calcio, hierro, zinc, magnesio y manganeso [EVANS, 1988; MARTIN, 1986].

Por otra parte, y oponiéndose a estos estudios, se han publicado otros trabajos donde se demuestra que el consumo de cantidades moderadas de ácido fítico junto a dietas equilibradas desde el punto de vista mineral no provocan problemas de biodisponibilidad [CULLUMBINE, 1950; DAVIDSSON, 1997; GRAF, 1984a; GRASES, 2001b; GRASES, 2004a; SANDSTROM, 2000; SIQUEIRA, 2001; WALWER, 1948]. Sólo en el caso de su consumo en grandes cantidades juntamente con dietas pobres en contenido mineral se pueden producir problemas de biodisponibilidad mineral [CULLUMBINE, 1950; KELSAY, 1987; SANDSTROM, 2000; WALWER, 1948]. Así, para inhibir la absorción de calcio en pacientes hipercalcémicos son necesarias dosis muy elevadas de fitato

sódico, 8.8 g por día [HENNEMAN, 1958], siendo la ingesta de fitato en una dieta mediterránea equilibrada de 0.7-1.4 g por día [MIRALPEIX, 1989].

### 3.4. Efectos beneficiosos del fitato

La posibilidad de determinar el fitato a los niveles fisiológicos (donde se encuentra a bajas concentraciones) [GRASES, 1996; GRASES, 2004b; MARCH, 1998; MARCH, 2001; PERELLÓ, 2004] ha permitido profundizar en el estudio de la actividad biológica real de esta molécula de manera que ha pasado de ser considerada una sustancia no deseada a un producto con beneficios importantes para la salud, siempre que se consuma en cantidades adecuadas y en una dieta más o menos equilibrada [CONTE, 1999; GRASES, 1989; GRASES, 1991; GRASES, 1994; HAWKINS, 1993; OWEN, 1996; REDDY, 1999; SHAMSUDDIN, 1995; SHAMSUDDIN, 1997]. De entre estos beneficios podemos destacar:

#### 3.4.1. Actividad antineoplásica (anticancerígena) del fitato

La incidencia de cáncer de colon en países industrializados es muy alta, siendo la dieta una factor determinante en su desarrollo y no tanto los factores genéticos [WYNDER, 1977]. La incidencia de este tipo de cáncer disminuye de forma considerable cuando se consumen dietas ricas en cereales, legumbres y frutas; es decir, dietas ricas en fitato [ARGILÉS, 1998; ENGLYST, 1982; GRAF, 1985; GRAF, 1993]. Varios estudios en modelos animales muestran que el fitato reduce la prevalencia, la frecuencia y el tamaño de los tumores, encontrando una relación dosis respuesta positiva [REDDY, 1999; ULLAH, 1990]. La adición de fitato en tan solo un 1-2 % en la dieta es suficiente para suprimir completamente el desarrollo de estos procesos cancerígenos [PRETLOW, 1992; SHAMSUDDIN, 1988; SHAMSUDDIN, 1989].

Estudios en los que se han usado cultivos celulares han demostrado la capacidad anticancerígena del fitato en una gran variedad de células y tejidos, sugiriendo un efecto antineoplásico al regular la proliferación celular pudiendo ser un agente químico-preventivo importante [SHAMSUDDIN, 1997]. Varios estudios en animales demuestran la acción del fitato en la prevención y en la disminución del número de tumores en el cáncer de mama [SHAMSUDDIN, 1999; THOMPSON, 1991; VUCENIK, 1993], en el cáncer de hígado [VUCENIK, 1998a], pudiendo presentar también un papel terapéutico importante para el tratamiento del Rabdomiosarcoma, un

tipo de cáncer que se origina en los tejidos blandos del cuerpo incluyendo músculos, tendones y tejido conectivo [VUCENIK, 1998b]. En general, los mecanismos de acción de la actividad anti-cáncer del fitato se pueden clasificar en tres bloques:

- Alteración genética: el fitato influye en genes reguladores del ciclo celular y en genes supresores de tumores [SHAMSUDDIN, 1997] e interfiere en procesos de transducción [HUANG, 1997].

- Exaltación inmunitaria: el fitato provoca un aumento de la respuesta inmunitaria [BATEN, 1989; MORRISON, 1994; REDDY, 1999; URBANO, 2000].

- Propiedades antioxidantes: el hierro es capaz de catalizar la formación de radicales libres hidroxilo [GRAF, 1984b]. Estos radicales libres son muy peligrosos siendo los responsables en muchas ocasiones de los procesos de iniciación tumoral. El fitato puede formar quelatos con el hierro evitando así la acción catalizadora de éste [GRAF, 1984b; GRAF, 1987; GRAF, 1990; HAWKINS, 1993; MIDORIKAWA, 2001], hecho que muy probablemente constituye la base de la capacidad antitumoral del fitato. Además, la progresión tumoral también se podría limitar por quelación de otros iones tales como magnesio y zinc, ya que ambos son críticos para la proliferación de las células tumorales [URBANO, 2000].

#### **3.4.2. Acción del fitato en enfermedades cardiovasculares**

##### **3.4.2.1. Dislipidemia**

El aumento del colesterol así como el de otras grasas (lípidos) en sangre, por encima de sus valores normales se denomina dislipidemia o dislipemia. Varios estudios demuestran el efecto beneficioso que podría ejercer el fitato en la reducción de los niveles de colesterol [TROWELL, 1972; TROWELL, 1973] y triglicéridos en sangre [JARIWALLA, 1999], como consecuencia de su capacidad para disminuir la lipogénesis hepática [KATAYAMA, 1999].



### 3.4.2.2. Agregación de plaquetas

La adhesión de plaquetas sobre las células endoteliales y su posterior agregación son pasos clave en el desarrollo de la aterosclerosis. Un estudio utilizando sangre humana demostró una disminución significativa de la agregación de plaquetas activadas (incubadas con fitato), encontrándose una relación dosis-respuesta positiva. Este hecho podría sugerir el papel potencial del fitato en la reducción de enfermedades cardiovasculares [VUCENIK, 1999].

### 3.4.3. Utilidad del fitato en el tratamiento de la hipercalcemia

En un estudio *in vivo* [GRASES, 2004c] se ha observado como la administración oral de sales de fitato (sódica, potásica, magnésica-potásica) da lugar a una disminución de la excreción y la concentración de calcio en orina (gracias a que captura el calcio dietético a nivel intestinal e impide su absorción) siendo ésta más significativa cuando se consumen dosis mayores de calcio. El fitato potásico es la sal que provoca una mayor reducción, siendo ésta más elevada a medida que aumenta la concentración de fitato administrado hasta un 1 %. Así, el fitato podría considerarse una alternativa (a los ortofosfatos, etc.) para el tratamiento de la hipercalcemia absorbible (el aumento de la absorción intestinal de calcio).

La fitina (fitato cálcico-magnésico), que es la sal natural de fitato, no presenta ningún efecto sobre el calcio urinario por la insolubilidad de la sal y por el hecho de llevar calcio ya incorporado en la molécula [GRASES, 2004c].

## BIBLIOGRAFÍA

- [ANDERSON, 1914] Anderson RJ (1914) The chemistry of phytin. *Bull* **32**, 3-44.
- [ARGILÉS, 1998] Argilés JM, López-Soriano FJ (1998) Catabolic proinflammatory cytokines. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **1**, 245-251.
- [BATEN, 1989] Baten A, Ullah A, Tomazic VJ, Shamsuddin AM (1989) Inositol-phosphate-induced enhancement of natural killer cell activity correlates with tumor suppression. *Carcinogenesis* **10**, 1595-1598.
- [CAMIRE, 1982] Camire AL, Clydesdale FM (1982) Analysis of phytic acid in foods by HPLC. *J Food Sci* **47**, 575-578.
- [CONTE, 1999] Conte A, García-Raja A, Grases F, Costa-Bauzá A, Prieto RM (1999) Urinary lithogen risk test: usefulness in the evaluation of renal lithiasis treatment using crystallization inhibitors. *Arch Esp Urol* **52**, 305-310.
- [CULLUMBINE, 1950] Cullumbine H, Basnayake V, Lemotee J (1950) Mineral metabolism on rice diets. *Br J Nutr* **4**, 101-111.
- [DAVIDSSON, 1997] Davidsson L, Galan P, Cherouvrier F, Kastenmayer P, Juillerat MA, Hercberg S, Hurrell RF (1997) Bioavailability in infants of iron from infant cereals: effect of dephytinization. *Am J Clin Nutr* **65**, 916-920.
- [DAVIES, 1979] Davies NT, Olpin, SE (1979) Studies on the phytate: zinc molar contents in diet as a determinant of Zn availability to young rats. *Br J Nutr* **41**, 590-603.
- [ENGLYST, 1982] Englyst HN, Bingham SA, Wiggins HS, Southgate DA, Seppanen R, Helms P, Anderson V, Day KC, Choolun R, Collinson E, Cummings JH (1982) Nonstarch polysaccharide consumption in four Scandinavian populations. *Nutr Cancer* **4**, 50-60.
- [ERDMAN, 1979] Erdman LW (1979) Oilseed phytate: nutritional implications. *J Am Oil Chem Soc* **56**, 736-741.
- [EVANS, 1988] Evans WJ, Martin CJ (1988) Interactions of Mg(II), Ni(II) and Zn(II) with phytic acid. VIII. A calorimetric study. *J Inor Biochem* **32**, 259-268.

- [FORBES, 1979] Forbes RM, Weingartner KE, Parker HM, Bell RR, Erdman JW (1979) Bioavailability to rats of zinc, magnesium and calcium in casein-, egg-, and soy protein-containing diets. *J Nutr* **109**, 1652-1660.
- [FORBES, 1984] Forbes RM, Parker HM, Erdman JW (1984) Effects of dietary phytate, calcium and magnesium levels on zinc bioavailability to rats. *J Nutr* **114**, 1421-1425.
- [FUJITANI, 1987] Fujitani T, Yoneyama M, Kabashima J, Hosokawa N, Ishikawa H (1987) Acute toxicity of phytic acid and sodium phytate in mice. *Kenkyu Nenpo-Tokio-toristu Eisei Kenkyusho* **38**, 368-370.
- [GIBSON, 1990] Gibson DM, Ullah ABJ (1990) Phytases and their action on phytic acid. En: Inositol metabolism in plants (Morré DJ, Boss WF, Loewus FA, eds.) pp.77-97, Wiley-Liss, New York.
- [GRAF, 1984a] Graf E, Eaton JW (1984) Effects of phytate on mineral bioavailability in mice. *J Nutr* **114**, 1192-1198.
- [GRAF, 1984b] Graf E, Mahoney JR, Bryant RG, Eaton JW (1984) Iron-catalyzed hydroxyl radical formation. Stringent requirement for free iron coordination site. *J Biol Chem* **259**, 3620-3624.
- [GRAF, 1985] Graf E, Eaton JW (1985) Dietary suppression of colonic cancer. Fiber or phytate? *Cancer* **56**, 717-718.
- [GRAF, 1987] Graf E, Empson KC, Eaton JW (1987) Phytic acid. A natural antioxidant. *J Biol Chem* **262**, 11647-11650.
- [GRAF, 1990] Graf E, Eaton JW (1990) Antioxidant functions of phytic acid. *Free Radic Biol Med* **8**, 61-69.
- [GRAF, 1993] Graf E, Eaton JW (1993) Suppression of colonic cancer by dietary phytic acid. *Nutr Cancer* **19**, 11-19.
- [GRASES, 1989] Grases F, March P (1989) A study about some phosphate derivatives as inhibitors of calcium oxalate crystal growth. *J Cryst Growth* **96**, 993-995.

- [GRASES, 1991] Grases F, Costa-Bauzá A (1991) Potentiometric study of the nucleation of calcium oxalate in presence of several additives. *Clin Chem Enzym Comms* **3**, 319-328.
- [GRASES, 1994] Grases F, Kroupa M, Costa-Bauzá A (1994) Studies on calcium oxalate monohydrate crystallization: influence of inhibitors. *Urol Res* **22**, 39-43.
- [GRASES, 1996] Grases F, Llobera A (1996) Determination of phytic acid in urine by ICP Atomic Emission Spectrometry. *Anal Letts* **29**, 1193-1199.
- [GRASES, 1998] Grases F, García-González R, Torres JJ, Llobera A (1998) Effects of phytic acid on renal stone formation in rats. *Scand J Urol Nephrol* **32**, 261-265.
- [GRASES, 2000a] Grases F, Simonet BM, March JG, Prieto RM (2000) Inositol hexakisphosphate in urine: the relationship between oral intake and urinary excretion. *BJU Int* **85**, 138-142.
- [GRASES, 2000b] Grases F, March JG, Prieto RM, Simonet BM, Costa-Bauzá A, Garcia-Raja A, Conte A (2000) Urinary phytate in calcium oxalate stone formers and healthy people. Dietary effects on phytate excretion. *Scand J Urol Nephrol* **34**, 162-164.
- [GRASES, 2001a] Grases F, Simonet BM, Prieto RM, March JG (2001) Phytate levels in diverse rat tissues: influence of dietary phytate. *Br J Nutr* **86**, 1-8.
- [GRASES, 2001b] Grases F, Simonet BM, Prieto RM, March JG (2001) Dietary phytate and mineral bioavailability. *J Trace Elem Med Biol* **15**, 221-228.
- [GRASES, 2001c] Grases F, Simonet BM, Prieto RM, March JG (2001) Variation of InsP<sub>4</sub>, InsP<sub>5</sub> and InsP<sub>6</sub> levels in tissues and biological fluids depending on dietary phytate. *J Nutr Biochem* **12**, 595-601.
- [GRASES, 2001d] Grases F, Simonet BM, Vucenik I, Prieto RM, Costa-Bauzá A, March JG, Shamsuddin AM (2001) Absorption and excretion of orally administered inositol hexaphosphate (IP<sub>6</sub> or phytate) in humans. *Biofactors* **15**, 53-61.

- [GRASES, 2004a] Grases F, Simonet BM, Perelló J, Costa-Bauzá A, Prieto RM (2004) Effect of phytate on element bioavailability in the second generation of rats. *J Trace Elem Med Biol* **17**, 229-234.
- [GRASES, 2004b] Grases F, Perelló J, Isern B, Prieto RM (2004) Determination of *myo*-inositol hexakisphosphate (phytate) in urine by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Anal Chim Acta* **510**, 41-43.
- [GRASES, 2004c] Grases F, Perelló J, Simonet BM, Prieto RM, García-Raja A (2004) Study of potassium phytate effects on decreasing urinary calcium in rats. *Urol Int* **72**, 237-243.
- [GRASES, 2005a] Grases F, Perelló J, Isern B, Prieto RM (2005) Study of the absorption of *myo*-inositol hexakisphosphate (InsP<sub>6</sub>) through the skin. *Biol Pharm Bull* **28**, 764-767.
- [GRASES, 2005b] Grases F, Perelló J, Isern B, Prieto RM (2005) Study of a *myo*-inositol hexaphosphate based cream to prevent dystrophic calcinosis cutis. *Br J Dermatol* **152**, 1022-1025.
- [GRASES, 2006] Grases F, Costa-Bauzá A, Perelló J, Isern B, Vucenik I, Valiente M, Muñoz JA, Prieto RM (2006) Influence of concomitant food intake on the excretion of orally administered *myo*-inositol hexaphosphate (InsP<sub>6</sub>) in humans. *J Med Food* **9**, 72-76.
- [GUPTA, 2003] Gupta KP, Singh J, Bharathi R (2003) Suppression of DMBA-induced mouse skin tumor development by inositol hexaphosphate and its mode of action. *Nutr Cancer* **46**, 66-72.
- [HADGRAFT, 2001] Hadgraft J (2001) Skin, the final frontier. *Int J Pharm* **224**, 1-18.
- [HARLAND, 1986] Harland BF, Oberleas D (1986) Anion exchange method for determination of phytate in foods: a collaborative study. *J AOAC* **69**, 667- 670.
- [HARLAND, 1987] Harland BF, Oberleas D (1987) Phytate in foods. *World Rev Nutr Diet* **52**, 235-259.
- [HARRISON, 1939] Harrison D, Mellanby E (1939) Phytic acid and the rickets-producing action of cereals. *Biochem J* **33**, 1660-1679.

- [HAWKINS, 1993] Hawkins PT, Poyner DR, Jackson TR, Letcher AJ, Lander DA, Irvine RF (1993) Inhibition of iron-catalysed hydroxyl radical formation by inositol polyphosphates: a possible physiological function for *myo*-inositol hexakisphosphate. *Biochem J* **294**, 929-934.
- [HENNEMAN, 1958] Henneman PH, Benedict PH, Forbes AP, Dudley HR (1958) Idiopathic hypercalciuria. *N Eng J Med* **17**, 802-807.
- [HUANG, 1997] Huang C, Ma WY, Hecht SS, Dong Z (1997) Inositol hexaphosphate inhibits cell transformation and activator protein 1 activation by targeting phosphatidylinositol-3' kinase. *Cancer Res* **57**, 2873-2878.
- [HURRELL, 1992] Hurrell RF, Juillerat MA, Reddy MB, Lynch SR, Dassenko SA, Cook JD (1992) Soy protein, phytate, and iron absorption in humans. *Am J Clin Nutr* **56**, 573-578.
- [ISHIKAWA, 1987] Ishikawa H, Ohishi S, Takahashi H, Yuzawa K, Hosokawa N, Hashimoto T (1987) Acute oral toxicities of phytic acid and sodium phytate in rats. *Kenkyu Nenpo-Tokio-toristu Eisei Kenkyusho* **38**, 371-376.
- [ISHIKAWA, 1999] Ishikawa T, Nakatsuru Y, Zarkovic M, Shamsuddin AM (1999) Inhibition of skin cancer by IP6 in vivo: initiation-promotion model. *Anticancer Res* **19**, 3749-3752.
- [JARIWALLA, 1999] Jariwalla RJ (1999) Inositol hexaphosphate (IP6) as an anti-neoplastic and lipid-lowering agent. *Anticancer Res* **19**, 3699-3702.
- [KATAYAMA, 1999] Katayama T (1999) Hypolipidemic action of phytic acid (IP6): prevention of fatty liver. *Anticancer Res* **19**, 3695-3698.
- [KELSAY, 1987] Kelsay JL (1987) Effects of fiber, phytic acid and oxalic acid in the diet on mineral bioavailability. *Am J Gastroent* **278**, 983-986.
- [KHOKHAR, 1994] Khokhar S, Pushpanjali, Fenwick GR (1994) Phytate content of indian foods and intakes by vegetarian indians of Hisar region, Haryana State. *J Agric Food Chem* **42**, 2440-2444.
- [KRSTIC, 1989] Krstic RV (1989) En *Los tejidos del hombre y de los mamíferos*. Editorial Interamericana, McGraw Hill, Madrid.

- [LEONHARD, 1991] Leonhard H (1991) En *Atlas de Anatomía*. Ediciones Omega, Barcelona.
- [LÓPEZ, 1986] López M (1986) En *Nou Atlas d'Anatomia Humana*. Editorial Ariel, Barcelona.
- [MAGA, 1982] Maga JA (1982) Phytate: its chemistry, occurrence, food interactions, nutritional significance, and methods of analysis. *J Agric Food Chem* **30**, 1-9.
- [MANARY, 2000] Manary MJ, Hotz C, Krebs NF, Gibson RS, Westcott JW, Arnold T, Broadhead RL, Hambidge KM (2000) Dietary phytate reduction improves zinc absorption in Malawian children recovering from tuberculosis but not in well children. *J Nutr* **130**, 2959-2964.
- [MARCH, 1998] March JG, Simonet BM, Grases F, Salvador A (1998) Indirect determination of phytic acid in urine. *Anal Chim Acta* **367**, 36-38.
- [MARCH, 2001] March JG, Simonet BM, Grases F (2001) Determination of phytic acid by gas chromatography-mass spectroscopy: application to biological samples. *J Chromatogr B* **757**, 247-255.
- [MARTIN, 1986] Martin CJ, Evans WJ (1986) Phytic acid-Zinc ion interactions: a calorimetric and titrimetric study. *J Inor Biochem* **26**, 169-183.
- [MELLANBY, 1925] Mellanby E (1925) Experimental rickets: the effects of cereals and their interaction with other factors of diet and environment in producing rickets. *Med Res Counc* **93**, 2-65.
- [MIDORIKAWA, 2001] Midorikawa K, Murata M, Oikawa S, Hiraku Y, Kawanishi S (2001) Protective effect of phytic acid on oxidative DNA damage with reference to cancer chemoprevention. *Biochem Biophys Res Commun* **288**, 552-557.
- [MIRALPEIX, 1989] Miralpeix A, Quer J (1989) En: *Gastronomia i dietètica per a col·lectivitats* (Eumo ed) Vic, Spain.
- [MOORE, 2002] Moore KL, Dalley AF (2002) En *Anatomía con orientación clínica*. Editorial médica panamericana, Madrid.

- [MORRISON, 1994] Morrison RS, Shi E, Kan M, Yamaguchi F, McKeehan W, Rudnicka-Nawrot M, Palczewski K (1994) Inositolhexakisphosphate (InsP6): an antagonist of fibroblast growth factor receptor binding and activity. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **30**, 783-789.
- [OGAWA, 1975] Ogawa M, Tanaka K, Kasai Z (1975) Isolation of high-phytin-containing particles from rice grains using an aqueous polymer two phase system. *Agric Biol Chem* **39**, 695-700.
- [OWEN, 1996] Owen RW, Weisgerber UM, Spiegelhalter B, Bartsch H (1996) Faecal phytic acid and its relation to other putative markers of risk for colorectal cancer. *Gut* **38**, 591-597.
- [PALLAUF, 1999] Pallauf J, Pippig S, Most E, Rimbach G (1999) Supplemental sodium phytate and microbial phytase influence iron availability in growing rats. *J Trace Elem Med Biol* **13**, 134-140.
- [PERELLÓ, 2004] Perelló J, Isern B, Muñoz JA, Valiente M, Grases F (2004) Determination of phytate in urine by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Chromatografia* **60**, 265-268.
- [POTTS, 1992] Potts RO, Bommannan D, Bommi G, Richard H (1992) Percutaneous absorption. *Pharmacol Skin*, 13-27.
- [PRETLOW, 1992] Pretlow TP, O'Riordan MA, Somich GA, Amini SB, Pretlow TG (1992) Aberrant crypts correlate with tumor incidence in F344 rats treated with azoxymethane and phytate. *Carcinogenesis* **13**, 1509-1512.
- [RABOY, 1990] Raboy V (1990) The biochemistry and genetics of phytic acid synthesis. En: Inositol metabolism in plants (Morré DJ, Boss WF, Locwus FA, eds.) pp.55-76, Wiley-Liss, New York.
- [RAVINDRAN, 1994] Ravindran V, Ravindran G, Sivalogan S (1994) Total and phytate phosphorus contents of various foods and feedstuffs of plant origino. *Food Chem* **50**, 133-136.
- [REDDY, 1982] Reddy NR, Sathe SK, Salunkhe DK (1982) Phytates in legumes and cereals. *Adv Food Res* **28**, 1-92.



- [REDDY, 1999] Reddy BS (1999) Prevention of colon carcinogenesis by components of dietary fiber. *Anticancer Res* **19**, 3681-3683.
- [REDDY, 2002] Reddy NR (2002) Occurrence, distribution, content and dietary intake of phytate. En: *Foods phytate* (Reddy NR, Sathe SK, eds.) pp 36-63 Boca ratón: CRC Press.
- [RICKARD, 1997] Rickard SE, Thompson LU (1997) Interactions and biological effects of phytic acid. *Acs Symp Ser* **662**, 294-312.
- [SANDSTROM, 2000] Sandstrom B, Bugel S, McGaw BA, Price J, Reid MD (2000) A high oat-bran intake does not impair zinc absorption in humans when added to a low-fiber animal protein-based diet. *J Nutr* **130**, 594-599.
- [SAUNAL, 1988] Saunal H (1988) Skin absorption promoters. *Bull Techn Gattefosse* **81**, 11-15.
- [SCHEUPLEIN, 1971] Scheuplein RJ, Blank IH (1971) Permeability of the skin. *Physiol Rev* **51**, 702-747.
- [SHAMSUDDIN, 1988] Shamsuddin AM, Elsayed AM, Ullah A (1988) Suppression of large intestinal cancer in F344 rats by inositol hexaphosphate. *Carcinogenesis* **9**, 577-580.
- [SHAMSUDDIN, 1989] Shamsuddin AM, Ullah A, Chakravarthy AK (1989) Inositol and inositol hexaphosphate suppress cell proliferation and tumor formation in CD-1 mice. *Carcinogenesis* **10**, 1461-1463.
- [SHAMSUDDIN, 1995] Shamsuddin AM (1995) Inositol phosphates have novel anticancer function. *J Nutr* **125**, S725-732.
- [SHAMSUDDIN, 1997] Shamsuddin AM, Vucenik I, Cole KE (1997) IP<sub>6</sub>: a novel anticancer agent. *Life Sci* **61**, 343-354.
- [SHAMSUDDIN, 1999] Shamsuddin AM, Vucenik I (1999) Mammary tumor inhibition by IP<sub>6</sub>: a review. *Anticancer Res* **19**, 3671-3674.
- [SIQUEIRA, 2001] Siqueira EM, Arruda SF, de Sousa LM, de Souza EM (2001) Phytate from an alternative dietary supplement has no effect on the calcium, iron and zinc status in undernourished rats. *Arch Latinoam Nutr* **51**, 250-257.

- [SWEENEY, 1970] Sweeny TM, Downing DT (1970) The role of the lipids in the epidermal barrier to water diffusion. *J Invest Dermatol* **55**, 135–140.
- [THIBODEAU, 2000] Thibodeau GA, Patton KT (2000). En *Anatomía y fisiología*. Ediciones Harcourt, Madrid.
- [THOMPSON, 1987] Thompson LU (1987) Reduction of phytic acid concentration in protein isolates by acylation techniques. *JAOCS* **64**, 1712-1717.
- [THOMPSON, 1991] Thompson LU, Zhang L (1991) Phytic acid and minerals: effect on early markers of risk for mammary and colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* **12**, 2041-2045.
- [TROWELL, 1972] Trowell H (1972) Dietary fibre and coronary heart disease. *Rev Eur Etud Clin Biol* **17**, 345-349.
- [TROWELL, 1973] Trowell H (1973) Tropical malabsorption and fiber-depleted starch carbohydrates. *Am J Clin Nutr* **26**, 477-478.
- [UEZEN, 1998] Uezen C, Posternak ME, Bustelo O, Graz S (1998) Ácido fítico en dermatología. *Act Terap Dermatol*, 1-3.
- [ULLAH, 1990] Ullah A, Shamsuddin AM (1990) Dose-dependent inhibition of large intestinal cancer by inositol hexaphosphate in F344 rats. *Carcinogenesis* **11**, 2219-2222.
- [URBANO, 2000] Urbano G, Lopez-Jurado M, Aranda P, Vidal-Valverde C, Tenorio E, Porres J (2000) The role of phytic acid in legumes: antinutrient or beneficial function? *J Physiol Biochem* **56**, 283-294.
- [VUCENIK, 1993] Vucenik I, Sakamoto K, Bansal M, Shamsuddin AM (1993) Inhibition of rat mammary carcinogenesis by inositol hexaphosphate (phytic acid). A pilot study. *Cancer Lett* **75**, 95-102.
- [VUCENIK, 1998a] Vucenik I, Zhang ZS, Shamsuddin AM (1998) IP6 in treatment of liver cancer. II. Intra-tumoral injection of IP6 regresses pre-existing human liver cancer xenotransplanted in nude mice. *Anticancer Res* **18**, 4091-4096.

- [VUCENIK, 1998b] Vucenik I, Kalebic T, Tantivejkul K, Shamsuddin AM (1998) Novel anticancer function of inositol hexaphosphate: inhibition of human rhabdomyosarcoma in vitro and in vivo. *Anticancer Res* **18**, 1377-1384.
- [VUCENIK, 1999] Vucenik I, Podczasy JJ, Shamsuddin AM (1999) Antiplatelet activity of inositol hexaphosphate (IP<sub>6</sub>). *Anticancer Res* **19**, 3689-3694.
- [WALWER, 1948] Walwer AR, Fox FW, Irving JT (1948) Studies in human mineral metabolism. I. The effect of bread rich in phytate phosphorous on the metabolism of certain mineral salts with especial reference to calcium. *Biochem J* **42**, 452-462.
- [WYNDER, 1977] Wynder EL, Hirayama T (1977) Comparative epidemiology of cancers of the United States and Japan. *Prev Med* **6**, 657-694.
- [ZHOU, 1992] Zhou JR, Fordyce EJ, Raboy V, Dickinson DB, Wong MS, Burns RA, Erdman JW (1992) Reduction of phytic acid in soybean products improves zinc bioavailability in rats. *J Nutr* **122**, 2466-2473.



# *Conclusiones*



## CONCLUSIONES

1. En estudios *in vitro* los detritus celulares y la mucina, a bajas concentraciones (inferiores a 100 mg/L para los detritus e inferiores a 15 mg/L a pH = 5.5 y a 250 mg/L a pH = 7.0 para la mucina) presentan capacidad inhibidora de la cristalización de oxalato cálcico monohidrato y de fosfato cálcico. Sin embargo, a mayores concentraciones, forman agregados que actúan como nucleantes heterogéneos.
2. El fitato, el pirofosfato, el citrato y el pentosan polisulfato inhiben de forma efectiva la formación de cristales de oxalato cálcico monohidrato sobre detritus celulares y mucina. Las concentraciones de estas sustancias con capacidad inhibidora efectiva (300 mg/L para el citrato, 1 mg/L para el pirofosfato y 1 mg/L para el fitato) son del mismo orden que las encontradas normalmente en orina.
3. El hecho de que la mucina y los detritus celulares tengan aparentemente un comportamiento antagónico como promotor y como inhibidor, puede explicarse si se considera su afinidad por el ión calcio, causando alteraciones en la cristalización de sales de calcio y, por tanto, actuando como inhibidor a bajas concentraciones. Sin embargo, a concentraciones elevadas, pueden formar partículas sólidas (agregados) que queden retenidas en cavidades de baja eficacia urodinámica, actuando como nucleantes heterogéneos e induciendo la formación de cristales.
4. Es muy difícil que en condiciones normales en orina humana se puedan formar cristales de  $\text{CaF}_2$  con capacidad para inducir nefrolitiasis. En el caso extremo de que pudieran llegar a formarse, aunque fuera en muy pequeña cantidad, podrían actuar como nucleantes heterogéneos activos del oxalato cálcico. No obstante, la actividad inhibidora del fitato y pirofosfato (a concentraciones encontradas normalmente en orina) puede prevenir dicha formación.
5. Los resultados observados, tanto *in vivo* como *in vitro*, demuestran que los fragmentos residuales post-LEOC sufren recrecimiento, lo que supone un gran riesgo de recidiva ya que actúan como núcleo para el crecimiento de nuevos cristales.
6. En todos los cálculos renales desarrollados *in vivo* sobre fragmentos post-LEOC se observa claramente en el fragmento el desarrollo de la zona externa del cálculo ya que el sentido de crecimiento de los cristales cambia bruscamente en determinadas caras. En los estudios *in vitro* se han obtenido los mismos patrones de crecimiento que en los

cálculos desarrollados *in vivo* sobre fragmentos post-LEOC, demostrándose así que es un modelo experimental adecuado para estudiar la evolución de la litiasis residual.

7. Sobre los fragmentos post-LEOC de oxalato cálcico monohidrato en condiciones de normocalciuria se desarrollan únicamente cristales de oxalato cálcico monohidrato. En condiciones de hipercalciuria y  $\text{pH} = 5.5$  los cristales formados son de oxalato cálcico dihidrato, mientras que a  $\text{pH} = 6.5$  se forma mayoritariamente hidroxiapatita y brushita.
8. Sobre los fragmentos post-LEOC de oxalato cálcico dihidrato en condiciones de normocalciuria y  $\text{pH} = 5.5$  únicamente se forman cristales de oxalato cálcico monohidrato. A  $\text{pH} = 5.5$  e hipercalciuria y a  $\text{pH} = 6.5$  y normocalciuria, se forman mayoritariamente cristales de oxalato cálcico monohidrato. También se pueden encontrar cristales de oxalato cálcico dihidrato y, sólo a  $\text{pH} = 6.5$ , pequeñas cantidades de hidroxiapatita. En condiciones de hipercalciuria y  $\text{pH} = 6.5$  se desarrollan de forma abundante cristales de oxalato cálcico dihidrato, aunque también pueden encontrarse cantidades significativas de hidroxiapatita y brushita, y en algunos casos cristales de oxalato cálcico monohidrato.
9. El fitato y el pirofosfato son dos inhibidores que reducen de forma efectiva el crecimiento de los fragmentos post-LEOC de oxalato cálcico monohidrato y oxalato cálcico dihidrato en las condiciones estudiadas, siendo el fitato el único que a valores de concentraciones encontradas normalmente en orina, puede bloquear totalmente el desarrollo de dichos cristales. El citrato, en las condiciones en que fue estudiado, no presentó ningún efecto inhibidor.
10. Sobre los fragmentos post-LEOC de hidroxiapatita a  $\text{pH} = 6.5$  y en condiciones de normocalciuria se observa la formación de cristales de oxalato cálcico monohidrato, mientras que en condiciones de hipercalciuria se observa principalmente la formación de brushita, aunque también se forma hidroxiapatita y oxalato cálcico dihidrato. Sin embargo, la presencia de fitato puede inhibir el desarrollo de dichos cristales.
11. El ritmo de crecimiento de los fragmentos en condiciones de hipercalciuria y  $\text{pH} = 6.5$  es muy superior al resto de situaciones estudiadas, por lo que la combinación de estas dos variables junto a la presencia de fragmentos residuales de cálculos supone un claro factor de riesgo para la recidiva.



12. En el estudio *in vivo*, solamente las ratas sometidas a inducción de calcinosis del *grupo no tratado con fitato* presentan depósitos importantes de calcio en los riñones. En este grupo, el análisis histológico del tejido papilar revela la presencia de depósitos cálcicos intratubulares y en los vasos sanguíneos. También se detectan áreas calcificadas en la papila renal. Sin embargo en los animales del *grupo control* y del *grupo tratado con fitato* no se observa la presencia de estos depósitos. El contenido total de calcio en riñón en el *grupo control* y en el *grupo tratado con fitato* es un 95 y un 91 % inferior respectivamente al del *grupo no tratado con fitato*, por tanto se demuestra claramente la acción del fitato como inhibidor de la cristalización a nivel de tejido intrapapilar.
13. El fitato administrado tópicamente en animales de experimentación se absorbe a través de la piel, llega a la sangre y se excreta finalmente a través de la orina. La absorción de fitato tiene lugar tanto cuando se administra en forma de crema como cuando se utiliza un gel. Este hecho es debido a que el fitato se encuentra en la misma forma y medio, a pesar de las diferencias existentes en las matrices vehiculares.
14. Existe una relación clara entre el fitato presente en la crema y/o gel y la concentración de fitato excretada en la orina. La absorción de fitato a través de la piel en animales de experimentación presenta niveles superiores cuando se utiliza el gel, aunque sólo se encuentran diferencias significativas entre la crema y el gel al 4 % después de 14 días de tratamiento.
15. La administración a través de la piel de fitato en humanos incrementa su concentración en fluidos biológicos, demostrando así que la administración tópica puede ser considerada como una nueva vía de aportación de fitato en humanos.

## ARTÍCULOS PUBLICADOS

1. Grases F., Isern B., Perelló J., Costa-Bauzá A. The role of glycoproteins in calcium oxalate crystal development. *BJU International* 94, 177-181 (2004).
2. Grases F., Isern B., Perello J., Costa-Bauza A. Role of the organic matter in calcium oxalate lithiasis. *Frontiers in Bioscience* 10, 1534-1538 (2005).
3. Grases F., Perelló J., Isern B., Costa-Bauzá A. Study of the relation between high fluoride intake and nephrolithiasis. *Current Urology*, en prensa.
4. Costa-Bauza A., Perelló J., Isern B., Grases F. Experimental study on residual lithiasis after shock wave lithotripsy. *Urological Research* 33, 51-56 (2005).
5. Costa-Bauzá A., Isern B., Perelló J., Sanchis P., Grases F. Factors affecting the regrowth of renal stones "in vitro". A contribution to the understanding of renal stone development. *Scandinavian Journal of Urology*, 39, 194-199 (2005).
6. Costa-Bauzá A., Perelló J., Isern B., Sanchis P., Grases F. Study of the factors that affect the regrowth of calcium oxalate dihydrate fragmented calculi. *BMC Urology* 6, 16-22 (2006).
7. Grases F., Isern B., Sanchis P., Perelló J., Torres J.J., Costa-Bauzá A. Phytate acts as an inhibitor in formation of renal calculi. *Frontiers in Bioscience* 12, 2580-2587 (2007).
8. Grases F., Isern B., Perelló J., Sanchis P., Prieto R.M. Absorption of myo-inositol hexakisphosphate (InsP<sub>6</sub>) through the skin: study of the matrix effects. Mechanism of phytate topical absorption. *Frontiers in Bioscience* 10, 799-802 (2005).
9. Grases F., Isern B., Perelló J., Sanchis P., Prieto R.M., Costa-Bauzá A. Absorption of myo-inositol hexakisphosphate (Insp<sub>6</sub>) through the skin in humans. *Die Pharmazie* 61, 652 (2006).